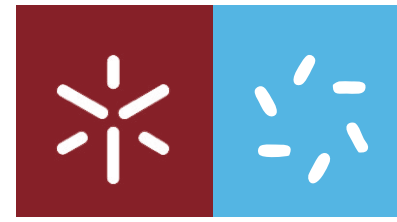


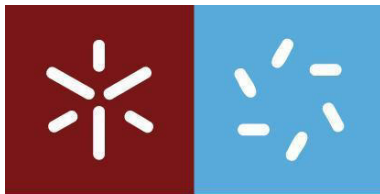


Sílvia Rodrigues Gavinho

Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de ferrite de cálcio para aplicações na entrega de fármacos antitumorais

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Sílvia Rodrigues Gavinho

Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de ferrite de cálcio para aplicações na entrega de fármacos antitumorais

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação

Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos Castanheira Coutinho

Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho

Dezembro de 2016

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO,
MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Doutora Elisabete Coutinho e Prof. Doutor Paulo Coutinho por terem sido incansáveis, pelo apoio, pela motivação, pela paciência, pela infinita disponibilidade e pelo conhecimento partilhado.

Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo e pelo auxílio em alguns métodos experimentais, em especial à Rita Rodrigues que sempre se mostrou disposta a ajudar-me no decorrer de todo o projeto e posteriormente na discussão dos resultados.

Aos meus pais, restante família, amigos e namorado por terem sempre uma palavra de incentivo.

Ao departamento de Física e Biologia da Universidade do Minho pela cedência do espaço, equipamento de caracterização e pelos materiais imprescindíveis no decorrer deste projeto.

RESUMO

Atualmente, o cancro tem-se apresentado como a doença que mais dificilmente se consegue diagnosticar pela sua atuação silenciosa e, cada vez mais, consegue arranjar estratégias para ultrapassar os tratamentos até agora desenvolvidos. Para além destes entraves, os tratamentos para combater esta doença têm sido apontados como ineficazes no que diz respeito à toxicidade e possivelmente a muitos efeitos secundários como a morte de células não cancerígenas. Neste âmbito foi necessário procurar alternativas para, de alguma forma, proteger as células não afetadas pela doença e para o tratamento ser mais direcionado e eficaz, onde a nanotecnologia tem dado passos largos neste sentido.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver magnetolipossomas (MLs) contendo nanopartículas magnéticas, neste caso, ferrite dopada com cálcio, para futura incorporação de um composto antitumoral. Estes dispositivos, para além de apresentarem propriedades biocompatíveis, têm o objetivo de serem facilmente direcionados para o local em tratamento através de um campo magnético externo e, para além de serem capazes de criar efeitos de hipertermia, o fármaco tem uma libertação controlada.

Com o propósito de dispor de um método de preparação ideal, eficaz e com baixos custos, foi necessário testar vários métodos de preparação e identificá-los como promissores no que diz respeito também às propriedades finais das nanopartículas.

Alguns métodos, nomeadamente com auxílio de surfactantes, resultaram em nanopartículas com dimensões relativamente reduzidas (~ 85 nm) e baixa polidispersividade, sendo provável a existência de NPs mais pequenas visivelmente comprovadas por imagens, relativas a um protocolo idêntico, contudo estas apresentavam-se bastante agregadas.

Foram estudadas as propriedades fotofísicas de um composto potencialmente antitumoral incorporado em lipossomas, permitindo apurar a sua presença na bicamada lipídica, demonstrando que os magnetolipossomas poderão ser um veículo eficaz para transporte do mesmo a células alvo.

Finalmente, foram feitos estudos de interação não específica entre MLs e células utilizando GUVs (vesículas unilamelares gigantes) como modelos de membrana celular. Esta avaliação foi feita através da técnica de FRET (transferência de energia ressonante de Förster), entre lípidos marcados com doadores de energia e sondas fluorescentes aceitantes incorporados nos magnetolipossomas.

ABSTRACT

Nowadays, cancer has been presented as the disease most difficult to diagnose due to its silent actuation and that can, increasingly, find strategies to overcome the treatments developed so far. In addition to these barriers, the treatments to fight this disease have been identified as ineffective in terms of toxicity and possibly with many side effects, such as the death of non-cancerous cells. In this context, it is necessary to look for alternatives to somehow protect the cells not affected by the disease and also for the therapy to be more targeted and effective, where nanotechnology has made great steps in that direction.

This study aimed to develop magnetoliposomes (MLs), containing magnetic nanoparticles of calcium ferrite, for future application in the delivery of a new antitumor compound. These nanosystems, presenting biocompatible properties, can be easily directed to the therapeutic site of interest by an applied external magnetic field, being able, in addition, to create hyperthermia effects and to perform the controlled release of drugs.

In order to obtain an optimal preparation method, efficient and with low cost, it was necessary to test several preparation methods and identifying them as promising in relation to the final properties of the nanoparticles. Some of the methods, particularly those employing surfactants as helpers, originated nanoparticles with relatively small size (~ 85 nm) and low polydispersity, the existence of smaller NPs also being probable, which was clearly proven by SEM images of particles obtained by a similar protocol, despite a significant aggregation.

The photophysical properties of a new potential antitumor compound incorporated in liposomes were studied, allowing concluding its location in the lipid bilayer, showing that magnetoliposomes may be an effective vehicle for the transport of this drug towards target cells.

Finally, studies of the non-specific interaction of magnetoliposomes with cells were performed using GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) as membrane models. This assessment was made using FRET (Förster Resonance Energy Transfer) between lipids labeled with an energy donor and fluorescent probes acting as acceptors, both incorporated in the magnetoliposomes.

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. Nanopartículas magnéticas | 1 |
| 1.1. Óxidos Magnéticos | 4 |
| 1.1.1. Óxidos de Ferro | 4 |
| 1.1.1.1. Fe_2O_4 (Ferrite) | 5 |
| 1.1.1.2. CaFe_2O_4 (Ferrite de Cálcio) | 5 |
| 1.2. Propriedades físicas | 6 |
| 1.3. Métodos de síntese | 11 |
| 1.3.1. Coprecipitação | 11 |
| 1.3.2. Microemulsão | 12 |
| 1.3.3. Método Sol-Gel | 13 |
| 1.4. Funcionalização da Superfície | 14 |
| 2. Lipossomas | 15 |
| 2.1. Constituição e características estruturais | 15 |
| 2.2. Aplicações | 18 |
| 3. Magnetolipossomas | 18 |
| 3.1. Propriedades | 19 |
| 3.2. Aplicações | 20 |
| 3.2.1. MLs na biotecnologia | 20 |
| 3.2.2. MLs na biomedicina | 20 |
| 3.2.2.1. MLs como agentes de contraste em MRI | 20 |
| 3.2.2.2. MLs como transportadores de fármacos | 21 |
| 3.2.2.3. MLs como mediadores no tratamento por hipertermia | 23 |
| 4. Referências do capítulo I | 25 |

| | |
|--|---------------|
| CAPÍTULO II - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO | 31 |
| 1. Espectroscopia | 31 |
| 1.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis | 31 |
| 1.1.1. Princípios básicos | 31 |
| 1.1.2. Lei de Lambert-Beer | 32 |
| 1.1.3. Espectrofotômetro | 34 |
| 1.2. Espectroscopia de fluorescência | 35 |
| 1.2.1. Diagrama de Jablonski | 36 |
| 1.2.2. Rendimento quântico de fluorescência | 37 |
| 1.2.3. Anisotropia de Fluorescência | 38 |
| 1.2.4. Transferência de Energia de Ressonância | 39 |
| 1.2.5. Espectrofluorímetro | 40 |
| 1.3. <i>Dynamic light scattering</i> (DLS) | 41 |
| 1.4. Difração de Raios-X (XRD) | 42 |
| 1.5. <i>Scanning Electronic Microscopy</i> (SEM) | 43 |
| 2. Referências do capítulo II | 45 |
| CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS | 47 |
| 1. Materiais | 47 |
| 1.1. Estudo fotofísico do composto em lipossomas | 47 |
| 1.2. Síntese de lipossomas com o composto | 48 |
| 1.3. Medição da anisotropia | 49 |
| 2. Síntese de nanopartículas de ferrite de cálcio (CaFe_2O_4) | 49 |
| 2.1. Síntese de nanopartículas por coprecipitação em solução aquosa | 49 |
| 2.2. Síntese de nanopartículas por coprecipitação em microemulsões | 50 |
| 2.3. Síntese de nanopartículas com vários surfactantes (CTAB, SDS, Triton-X) e Ácido Cítrico | 53 |

| | |
|---|----|
| 2.4. Síntese de nanopartículas em micelas invertidas | 54 |
| 3. Síntese de magnetolipossomas | 56 |
| 3.1. Síntese de magnetolipossomas sólidos | 56 |
| 3.1.1. Síntese de magnetolipossomas sólidos com diferentes tipos de lípidos (DOPG, DPPC, DODAC) e com surfactante AOT | 56 |
| 3.1.2. Síntese de magnetolipossomas sólidos usando nanopartículas calcinadas | 58 |
| 3.1.3. Verificação da formação da segunda camada lipídica dos magnetolipossomas sólidos | 59 |
| 3.2. Síntese de magnetolipossomas aquosos (AMLs) | 60 |
| 3.2.1. Síntese de magnetolipossomas aquosos (AMLs) marcados com sondas fluorescentes | 60 |
| 4. Interação com modelos de membranas biológicas | 61 |
| 4.1. Preparação dos modelos de membrana - GUVs | 61 |
| 4.2. Estudos de transferência de energia | 61 |
| 5. Referências do capítulo III | 63 |
| CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 1. Estudo fotofísico do composto em membranas lipídicas | 65 |
| 2. Caracterização das nanopartículas de ferrite de cálcio | 67 |
| 2.1. Espectros de absorção | 67 |
| 2.2. Caracterização do tamanho e polidispersividade | 70 |
| 2.3. Avaliação das propriedades magnéticas das nanopartículas | 73 |
| 3. Caracterização dos magnetolipossomas | 74 |
| 4. Ensaios de interação dos MLs com modelos de membrana por FRET | 75 |
| 4.1. Ensaios de interação dos AMLs com GUVs | 75 |
| 4.2. Formação de SMLs e interação com GUVs | 77 |
| 5. Referências do capítulo IV | 81 |

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma das áreas de pesquisa mais importantes na ciência moderna e tem permitido que cientistas, engenheiros, químicos e médicos trabalhem a nível molecular e celular, no intuito de produzir avanços importantes nas ciências da vida, principalmente na vertente da saúde. O uso de materiais constituídos por nanopartículas (NPs) oferece grandes vantagens devido ao seu tamanho e às suas propriedades físico-químicas únicas [1].

1. Nanopartículas magnéticas

Nanopartículas são partículas ultrafinas de dimensões nanométricas com tamanhos localizados entre as moléculas e estruturas microscópicas. Vistas como materiais, elas são tão pequenas que apresentam características que não são observadas em estruturas maiores (até 100 nm); vistas como moléculas, elas são tão grandes que fornecem acesso aos reinos de comportamento quântico, que não são acessíveis de outra forma. O uso real de materiais nanoestruturados nas ciências da vida tem sido comum na atualidade. De facto, as excelentes propriedades destes materiais proporcionam um futuro muito promissor para a sua utilização neste domínio. Neste âmbito, muitos avanços recentes têm sido feitos em biologia, química e física [2].

Os materiais magnéticos, com base em metais como o ferro, cobalto e níquel ou óxidos metálicos, foram envolvidos de diferentes maneiras no desenvolvimento da tecnologia moderna. Podemos encontrá-los em muitos dispositivos, tais como motores, geradores, sensores, fitas de vídeo e discos rígidos. Por isso, o grande interesse na miniaturização destes materiais pode ser facilmente compreendido. Isto é particularmente válido quando se fala de materiais magnéticos de muito pequena escala, como por exemplo, de nanopartículas magnéticas (MNPs) [3].

Devido a aplicações generalizadas das nanopartículas magnéticas na biotecnologia, biomedicina, ciência dos materiais, engenharia e áreas ambientais, tem sido dada muita atenção para a síntese dos diferentes tipos de MNPs. Aplicações industriais de nanopartículas magnéticas cobrem um amplo espectro de meios de gravação magnéticos e aplicações biomédicas, por exemplo, na ressonância magnética como meio de contraste e auxiliando agentes terapêuticos no tratamento do cancro (Figura 1) [1].

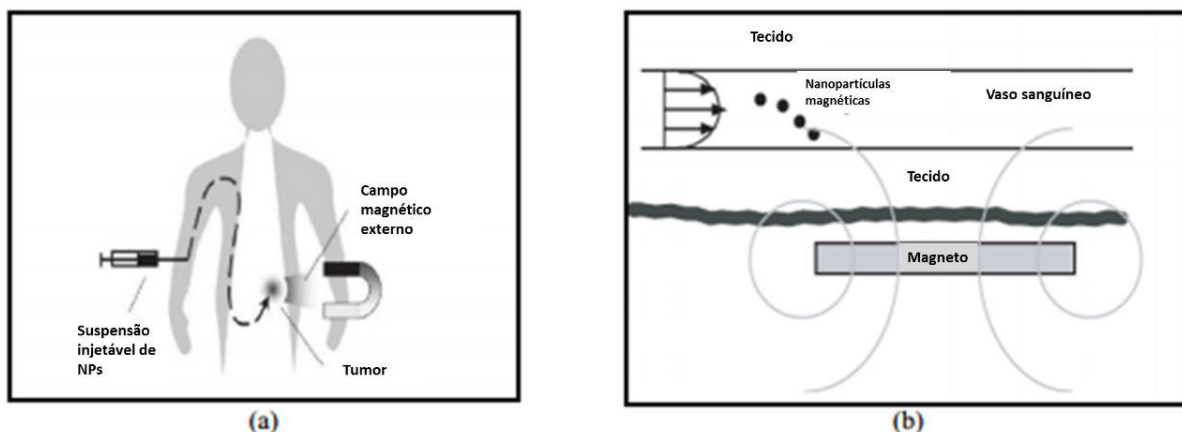


Figura 1 – Sistema de entrega de fármacos. (a) mecanismo do campo magnético na entrega guiada de fármacos, (b) corte transversal de um vaso sanguíneo e o aprisionamento das partículas no seu interior (adaptado de [4]).

As principais vantagens da utilização de partículas de tamanhos inferiores a 100 nm são as áreas de superfície eficazes, as taxas de sedimentação mais baixas e melhor difusão nos tecidos.

Cada aplicação potencial das nanopartículas magnéticas exige ter propriedades diferentes. Para utilizações biomédicas, é preferível a aplicação de partículas que apresentam comportamento superparamagnético à temperatura ambiente [5, 6]. As aplicações em terapêuticas e diagnósticos médicos exigem que as partículas magnéticas sejam estáveis em água, a pH próximo de 7, e num ambiente fisiológico. Além disso, para aplicações biomédicas *in vivo*, as nanopartículas magnéticas devem ser sintetizadas com um material não tóxico e não imunogénico, com partículas de tamanho pequeno o suficiente para permanecer na circulação após a injeção, e para passar através dos sistemas capilares de órgãos e tecidos, evitando embolias. Devem também ter uma elevada magnetização, de modo que o seu movimento no sangue possa ser controlado com um campo magnético e de forma que eles possam ser imobilizados perto do tecido patológico alvo [1]. A estabilidade coloidal deste fluido irá depender da carga e da química à sua superfície e das dimensões das partículas, que devem ser suficientemente pequenas para que a precipitação, devido às forças gravitacionais, possa ser evitada [7]. Existem, ainda outras possíveis restrições adicionais às partículas, quando utilizadas em aplicações biomédicas (aplicações *in vivo* ou *in vitro*). Para aplicações *in vivo*, as nanopartículas magnéticas devem ser encapsuladas num polímero ou outro sistema biocompatível, durante ou após o processo de preparação, para evitar alterações da estrutura original, a formação de grandes agregados, e a biodegradação quando expostas ao sistema biológico. As nanopartículas revestidas com um polímero também irão permitir a ligação de fármacos por aprisionamento às partículas, adsorção ou ligação covalente [8-10].

Os principais fatores que determinam a toxicidade e a biocompatibilidade destes materiais são a natureza dos componentes que respondem magneticamente e o tamanho final das partículas, o seu núcleo, e os revestimentos. Nanopartículas de óxido de ferro, tais como magnetite (Fe_3O_4), maguemite ou a sua forma oxidada ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são, de longe, as nanopartículas mais vulgarmente utilizadas para aplicações biomédicas. Materiais altamente magnéticos, tais como o cobalto e o níquel são suscetíveis à oxidação e são potencialmente tóxicos; portanto, eles são de pouco interesse para aplicações biomédicas, necessitando de modificação ou revestimento para serem utilizados [1].

Em quase todas as utilizações, o método de síntese dos nanomateriais representa um dos desafios mais importantes que irão determinar a forma, a distribuição de tamanho, o tamanho das partículas, a química da superfície das partículas e, conseqüentemente, as suas propriedades magnéticas [1].

Materiais ferri - e ferromagnéticos tais como Fe_3O_4 e algumas ligas, apresentam partículas com formas irregulares quando obtidas por moagem a partir de materiais em forma *bulk*, mas podem ter uma forma esférica quando sintetizadas por atomização de plasma, aerossóis, entre outras técnicas. Dependendo do mecanismo de formação, as partículas esféricas obtidas numa solução podem surgir com forma cristalina ou amorfa, se resultarem de uma agregação ordenada ou desordenada, respetivamente. Além disso, o método de síntese determina em grande medida o grau de defeitos estruturais ou impurezas na partícula, bem como a distribuição de tais defeitos no interior da partícula, portanto, determinando o seu comportamento magnético [1].

Recentemente, muitas tentativas foram feitas para o desenvolvimento de técnicas e processos que produzem soluções 'coloidais monodispersas' contendo nanopartículas uniformes, tanto em tamanho como em forma. Nestes sistemas, todas as propriedades físico-químicas da solução refletem diretamente as propriedades de cada uma das partículas constituintes, sendo utilizados como modelos para a avaliação das propriedades que dependem do tamanho e forma das partículas [1].

Nanopartículas magnéticas mostram novos fenómenos notáveis como a alta irreversibilidade do campo, níveis de saturação de campo elevados, superparamagnetismo, contribuições extras de anisotropia, ou mudança de forma após o arrefecimento do campo. Esses fenómenos surgem de efeitos limitados e finitos de tamanho e efeitos de superfície que dominam o comportamento magnético de nanopartículas individuais [11].

Em suma, nos últimos anos, o interesse relativamente ao desenvolvimento de nanopartículas magnéticas, bem como a informação acerca do seu comportamento, e a melhoria

da sua aplicabilidade em diversas áreas, têm aumentado consideravelmente, resultando num controlo bastante preciso sobre as condições de síntese e a funcionalização da superfície das MNPs, pois são estas que determinam as suas propriedades físico-químicas, a sua estabilidade coloidal e o seu comportamento perante um sistema biológico [12-14].

As MNPs que possuem propriedades físico-químicas apropriadas e superfícies adequadas têm sido amplamente estudadas para diversas aplicações, tais como entrega de fármacos, hipertermia, imagiologia de ressonância magnética (MRI), engenharia de tecidos, biossensores, separação bioquímica e bioanálise. No campo da terapia da doença, o desenvolvimento de "teragnósticos", que facilita a entrega simultânea de fármacos e a aquisição de imagem, representa um importante avanço na tecnologia das MNPs. Atualmente, vários ensaios clínicos estão em desenvolvimento no sentido de investigar o potencial de diferentes nanossistemas magnéticos para aplicações farmacêuticas e biomédicas [12, 15, 16].

1.1. Óxidos Magnéticos

1.1.1. Óxidos de Ferro

Os óxidos de ferro têm recebido cada vez mais atenção devido às suas inúmeras aplicações, sendo utilizados como meios de gravação magnética, catalisadores, dispositivos óticos e dispositivos eletromagnéticos. Eles existem numa ampla variedade de estruturas (polimórficas) e estados de hidratação. Até recentemente, o conhecimento dos detalhes estruturais, da termodinâmica e reatividade dos óxidos de ferro tem sido escasso. Além disso, as propriedades físicas (magnéticas) e químicas normalmente alteram com o tamanho das partículas e o grau de hidratação, tornando mais difícil o seu estudo detalhado [17].

Por definição, as partículas de óxido de ferro superparamagnéticas são geralmente classificadas no que respeita ao seu tamanho por partículas de óxido de ferro superparamagnético (SPIO), apresentando diâmetros hidrodinâmicos maiores que 30 nm, e por partículas de óxido de ferro superparamagnéticas *ultrasmall* (USPIO), com diâmetros hidrodinâmicos menores do que 30 nm. As USPIO são agentes de contraste eficazes atualmente utilizados para reforçar as diferenças na relaxação entre tecidos saudáveis e patológicos, devido à sua alta magnetização de saturação, elevada suscetibilidade magnética e baixa toxicidade. A biodistribuição e contraste resultante destas partículas são altamente dependentes do seu percurso sintético, forma e tamanho [17].

Tem havido muito interesse no desenvolvimento de métodos de síntese para produzir sistemas de óxido de ferro de alta qualidade. Nanomateriais de óxido de ferro de alta qualidade foram sintetizados usando métodos em solução a altas temperaturas, semelhantes aos utilizados para os pontos quânticos semicondutores. Foram também propostos outros métodos de síntese, tais como mediados por poliol, sol-gel e sonoquímica. Foi ainda demonstrada a eficácia das vias não aquosas para a produção de nanopartículas de óxido de ferro [17].

1.1.1.1. Fe_2O_4 (Ferrite)

Óxidos de ferro como as ferrites têm sido amplamente utilizados e investigados nos últimos anos devido às suas propriedades e aplicações em sistemas de armazenamento de informação magnética, aumentando a densidade de informação gravada, fluídos magnéticos, diagnósticos médicos [18].

Em termos de síntese foi descrito que a moagem de pós de ferrite microcristalina com o objetivo de atingir grãos com tamanho nano é ineficaz, pois essa técnica proporciona partículas com uma ampla distribuição de tamanhos, e o conteúdo da fração com a dimensão ótima das partículas (30-50 nm), é relativamente baixo [17].

Ferrites nanocristalinas são frequentemente preparadas pelo método de coprecipitação. Para além dessa técnica têm sido desenvolvidos métodos para a preparação de nanopartículas de ferrite de diferentes composições em soluções a temperaturas moderadas. Em primeiro lugar, é de referir o método de sol-gel, resultando num pó altamente disperso com pureza e homogeneidade requerida [17].

Para a síntese de nanopartículas de ferrite também são amplamente utilizadas as técnicas de microemulsões do tipo óleo-em-água e água-em-óleo (micelas invertidas) [19, 20] .

1.1.1.2. CaFe_2O_4 (Ferrite de Cálcio)

Independentemente do tamanho, a maioria das ferrites bem conhecidas tem estrutura *spinel*, no entanto, a ferrite de cálcio (CaFe_2O_4) apresenta uma estrutura ortorrômbica já relatada [21]. A ferrite de cálcio tem sido objeto de um grande número de estudos, devido às suas aplicações como catalisadores de oxidação, sensores de alta temperatura, absorvedores de gás, etc [22]. Recentemente, foi observado que são materiais promissores para os dispositivos

eletroquímicos de alta temperatura, tais como membranas de cerâmica e elétrodos para células de combustível. Nesta perspectiva, é muito interessante ter um estudo detalhado sobre as propriedades estruturais e magnéticas dependentes do tamanho de uma CaFe_2O_4 recém-sintetizada através da síntese por método de sol-gel [23].

Além disso, estudos mostram que a ferrite de cálcio apresenta características físicas notáveis, tal como elevada estabilidade térmica, o que faz com que seja aplicável sobre um amplo intervalo de temperatura. Por outro lado, nanopartículas de CaFe_2O_4 têm sido intensivamente exploradas como o futuro sistema de entrega de fármacos, devido às suas propriedades físicas únicas, à capacidade para serem utilizados em interações biomoleculares e biocelulares e também pelas suas excelentes propriedades magnéticas [21].

Atualmente, já existem relatos da utilização de partículas de ferrite de cálcio para aplicação biomédica. Quando comparado com outros ferrites como MnFe_2O_4 , NiFe_2O_4 , ZnFe_2O_4 , CoFe_2O_4 e CuFe_2O_4 , é claro que CaFe_2O_4 tem uma vantagem significativa; é biocompatível e ecológico, devido à presença de Ca^{2+} , em vez de metais pesados. Também possui propriedades de magnetização de saturação mais baixa em comparação com outras ferrites, que impede a agregação e acelera a dispersão das soluções aquosas [22].

1.2. Propriedades físicas

A origem das propriedades magnéticas encontra-se nos movimentos de orbitais e de spin dos elétrons, cuja rotação e movimento angular cria um dipolo magnético chamado momento magnético. A interação entre os momentos magnéticos dos átomos do mesmo material provoca uma ordem, abaixo de uma certa temperatura crítica. Podemos classificar materiais *bulk* com base nessas interações e no comportamento dos materiais em resposta a campos magnéticos em diferentes temperaturas (por exemplo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo, paramagnetismo, etc.). Materiais magnéticos são compostos por regiões, chamadas domínios magnéticos, dentro dos quais há um alinhamento dos momentos magnéticos. Se o volume do material é reduzido, como no caso das MNPs, numa situação em que apenas um domínio é atingido, as propriedades magnéticas não são mais semelhantes às do material *bulk* [3].

Em materiais *bulk*, os principais parâmetros para caracterizar as propriedades magnéticas como coercividade (H_c) e suscetibilidade (χ) são: composição, estrutura cristalográfica, lacunas e defeitos, e anisotropia magnética. Além disso, como anteriormente

citado, para MNPs na nanoescala, a forma e o tamanho também determinam o seu comportamento magnético [3].

Nos materiais ferromagnéticos, os momentos magnéticos estão associados em grupos. Um domínio magnético (também chamado de domínio Weiss) refere-se a um volume de material ferromagnético, em que todos os momentos magnéticos estão alinhados na mesma direção quando lhes é aplicado uma força externa. Este conceito de domínios distingue ferromagnetismo de paramagnetismo. A estrutura do domínio de um material ferromagnético determina a dependência do tamanho no seu comportamento magnético. Quando o tamanho de um material ferromagnético é reduzido, abaixo de um valor crítico, torna-se um único domínio [1].

De acordo com a teoria de domínio magnético, a dimensão crítica do domínio único é afetada por vários fatores, incluindo o valor da saturação magnética, a intensidade da energia de anisotropia cristalina e taxas de forças, ou a superfície da parede do domínio, e a forma das partículas. A reação dos materiais ferromagnéticos a um campo aplicado é bem descrita por um ciclo de histerese, que é caracterizado por dois parâmetros principais: remanescência (retendo a magnetização mesmo após não estando sob o efeito de um campo magnético) e coercividade. A última está relacionada com a amplitude da curva. Lidando com partículas finas, a coercividade é a única propriedade de maior interesse, e é fortemente dependente do tamanho. Verificou-se que à medida que o tamanho da partícula é reduzido, a coercividade aumenta até um máximo e depois diminui para zero (Figura 2) [1].

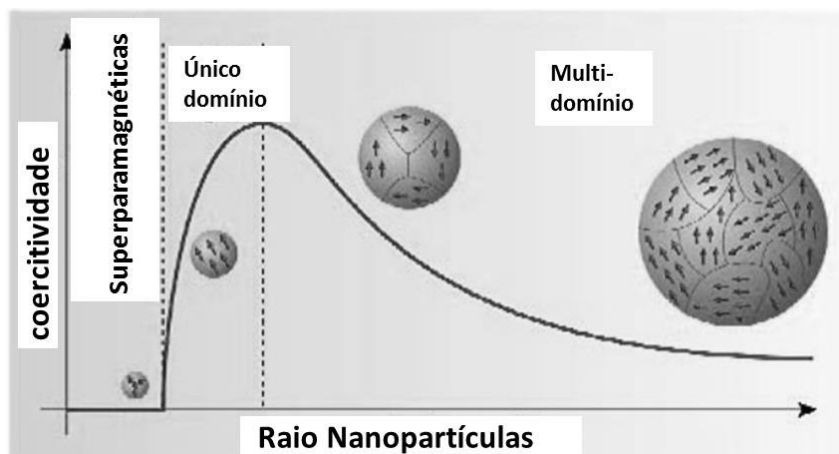


Figura 2 - Ilustração esquemática da relação tamanho-coercividade de pequenas partículas (adaptado de [1]).

Quando o tamanho das partículas de domínio único diminui ainda mais abaixo de um diâmetro crítico, a coercividade torna-se zero, e tais partículas tornam-se superparamagnéticas.

Nanopartículas superparamagnéticas tornam-se magnéticas na presença de um magneto externo, mas reverterem para um estado não magnético, quando o magneto externo é removido, não existindo remanescência. Isso evita um comportamento "ativo" das partículas quando não há nenhum campo aplicado. Introduzido nos sistemas vivos, as partículas são "magnéticas" apenas na presença de um campo externo, o que lhes confere vantagem única para trabalhar em ambientes biológicos (figura 3) [1].

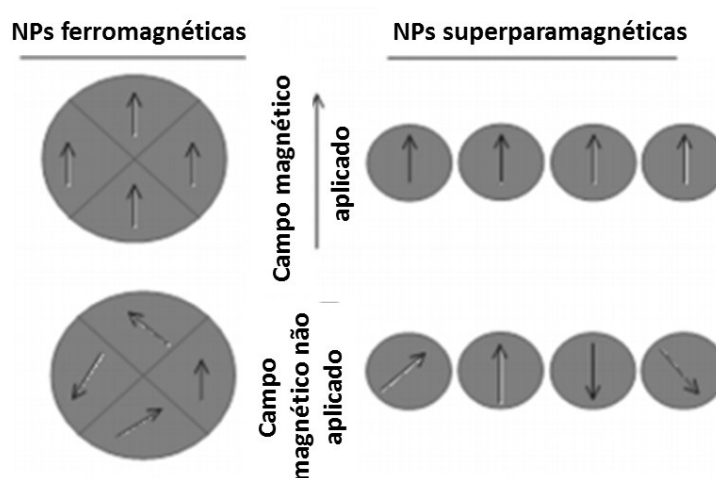


Figura 3 - Comportamento magnético de NPs ferromagnéticas e superparamagnéticas sob um campo magnético externo. Sob influência de um campo magnético externo, os domínios de NPs ferromagnéticas alinham com o campo aplicado. O momento magnético de um domínio único das NPs superparamagnéticas alinha com o campo aplicado. Na ausência de um campo externo, as NPs ferromagnéticas manterão uma magnetização líquida, ao contrário das NPs superparamagnéticas que não exibirão magnetização líquida devido à rápida inversão do momento magnético (adaptado de [1]).

Devido ao seu pequeno volume, as MNPs geralmente apresentam comportamento superparamagnético. Nestes casos a energia térmica pode ser suficiente para alterar a magnetização espontânea dentro de cada MNP. Por outras palavras, o momento magnético de cada MNP será capaz de rodar de forma aleatória (em referência à orientação da MNP), apenas devido à influência da temperatura. Por esta razão, na ausência de um campo eletromagnético, o momento magnético de um sistema contendo MNPs será zero a temperaturas bastante elevadas. Esta propriedade, marcada pela falta de magnetização remanescente após a remoção de campos externos, permite que as MNPs mantenham a sua estabilidade coloidal e evita a aglomeração, o que é importante para aplicações biomédicas [3].

A barreira de energia anisotrópica magnética a partir do estado *spin-up* para o estado de *spin-down* é proporcional ao produto da constante de anisotropia magnética (K) e ao volume do magneto. Portanto, o superparamagnetismo depende do tamanho da MNP. Em geral, quanto menor for o tamanho da MNP, menor será a sua temperatura de transição de ferromagnético para comportamento superparamagnético. A redução de tamanho reflete-se também no aumento da contribuição relativa dos efeitos de superfície. Por exemplo, uma redução de tamanho de 12 para 5 nm em maguemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) pode levar a uma diminuição da saturação de magnetização para metade do valor teórico, principalmente devido à desordem da superfície. Para além dos efeitos do tamanho, a forma da MNP é conhecida por influenciar fortemente a anisotropia magnética e, conseqüentemente, a barreira anisotrópica magnética e as propriedades integrais magnéticas do nanomaterial [3].

Em geral, pode parecer que os grandes momentos magnéticos são os preferidos para a maioria das aplicações, já que isso iria reduzir a quantidade de MNPs necessárias. No entanto, quando se trata de aplicações biológicas, a biocompatibilidade alcança grande importância, pelo que a acumulação ou efeitos tóxicos das MNPs precisam de ser reduzidos, tanto quanto possível. Portanto, na maior parte dos casos, um equilíbrio entre momentos magnéticos elevados e biocompatibilidade deve ser alcançado. Esta é a razão pela qual as MNPs à base de ferro são muitas vezes preferidas em relação a outras baseadas em metais de transição mais tóxicos. Um dos exemplos de maior biocompatibilidade é o caso das MNPs de ferrite de cálcio preparadas neste trabalho. Para aplicações biomédicas, os diâmetros ideais de MNPs baseadas em ferrite, ou seja, óxidos de metal mistos com ferro (III) como componente de óxido principal, estão compreendidos entre o limite superparamagnético à temperatura ambiente (10 nm) e o tamanho de um único domínio crítico (~70 nm) [3].

O revestimento das MNPs é também um elemento chave, de modo a poderem ligar-se especificamente a outros compostos ou para evitar a aglomeração, mas que também irá afetar as propriedades magnéticas das MNPs, devido à elevada área superficial específica e à grande quantidade de átomos na superfície.

No entanto, foi também observado que é possível manter as propriedades magnéticas inalteradas se as MNPs forem revestidas com fosfanatos. Pode concluir-se que as diferenças na natureza do agente acoplador e o tipo de interação entre o ligando e a superfície da MNP podem explicar as variações nos valores de magnetização [3].

A aplicação de um campo magnético externo alternado (AMF) em MNPs leva à produção de energia, sob a forma de calor, quando o campo magnético é capaz de reorientar os

momentos magnéticos das MNPs [24]. Tal efeito pode ser explorado para usar MNPs como mediadores em hipertermia magnética.

O aquecimento local acima da temperatura fisiológica tem sido demonstrado ser uma das causas de morte celular, mas os mecanismos não são totalmente entendidos. Desta forma, se for possível direcionar as MNPs para um tecido tumoral, será possível aquecê-lo seletivamente, sem danificar o tecido saudável circundante [3].

As MNPs também são capazes de criar pequenos campos magnéticos locais, que causam uma diminuição dos tempos de relaxação (T_1 e T_2 , tempos de relaxação de prótons longitudinal e transversal, respetivamente) dos prótons circundantes. Este efeito é chamado reforço de relaxação de prótons e leva a uma alteração da intensidade do sinal de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) nos seus arredores. O contraste de uma MRI é melhorado devido à presença de MNPs que atuam como agentes de contraste. O aumento de contraste de MRI baseia-se na diferente imersão das MNPs em células de diferentes características [25]. Foi demonstrado que o uso de MNPs superparamagnéticas de óxido de ferro melhora a detecção de lesões e a precisão do diagnóstico de MRI [26].

Outra vantagem do uso de MNPs em aplicações biológicas é que estas podem ser controladas *in vivo* por medições magnéticas, que são muito sensíveis e oferecem informação substancial. A monitorização é baseada na interação das MNPs com diferentes tecidos e células. A marcação de uma área de interesse biológico é possível principalmente devido à conjugação das MNPs com uma superfície celular específica ou devido à submersão das MNPs [3].

O *design* adaptado de colóides de MNPs desempenha um papel crucial na determinação da eficácia de nanoestruturas magnéticas funcionais para uma determinada aplicação biomédica. Uma série de requisitos fundamentais relacionados com as propriedades intrínsecas do material magnético, para a ocorrência de efeitos de tamanho e forma, devem ser tomados em consideração, como a natureza da sua superfície, para a estabilidade no ambiente rico em água, bem como a sua não-toxicidade. Enquanto que o tamanho e a forma da MNP, o revestimento da superfície e a estabilidade coloidal podem ser sintonizados por meio de procedimentos de síntese apropriados, a escolha do material magnético é bastante restrita com base em óxidos de ferro magnéticos, que representam até à data o melhor compromisso entre as boas propriedades magnéticas (por exemplo, a magnetização de saturação) e estabilidade, sob condições de oxidação e toxicidade limitada [3].

Apesar dos óxidos de ferro terem sido e ainda serem os mais amplamente encontrados, as aplicações biomédicas de ferrites magnéticas estão a ser intensamente investigadas. Em particular, ferrites magnéticas em *spinel* com substituição do grupo M na fórmula geral MFe_2O_4

(em que $M = \text{Zn}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+} \dots$) oferecem a oportunidade de ajustar as propriedades magnéticas do núcleo inorgânico [3].

Em particular, MNPs de óxido de ferro contendo manganês ou cobalto têm mostrado propriedades magnéticas melhoradas em relação a MNPs de Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [27], o que conduz a uma melhoria do sinal de ressonância magnética, como é o caso de ferrite de manganês, ou uma SAR (taxa de absorção específica) mais eficiente, como é no caso das ferrites de cobalto. Uma consequência disso é que, apesar das preocupações toxicológicas relacionadas com a fuga de íons tóxicos, as ferrites substituídas com elevada anisotropia, como CoFe_2O_4 , podem ser adequadas para utilização biomédica como MNPs de tamanho significativamente menor do que outras MNPs de óxido de ferro, sendo suscetíveis de ser facilmente eliminadas pelo corpo humano [3].

1.3. Métodos de síntese

1.3.1. Coprecipitação

Existem dois métodos principais para a síntese em solução de partículas esféricas de magnetite na gama do nanómetro. No primeiro, as suspensões de hidróxidos ferrosos são parcialmente oxidadas com agentes oxidantes diferentes. Por exemplo, partículas de magnetite esféricas de distribuição de tamanhos estreita com diâmetros médios entre 30 e 100 nm, podem ser obtidas a partir de um sal de Fe (II), uma base e um oxidante suave (íons nitrato) [2].

O outro método consiste em misturas estequiométricas de hidróxidos de metais ferrosos e férricos em meio aquoso, obtendo-se partículas de magnetite esféricas homogêneas em tamanho. Além disso, demonstrou-se que, ajustando o pH e a força iónica do meio de precipitação, é possível controlar o tamanho médio das partículas ao longo de uma ordem de magnitude (15-2 nm). O tamanho diminui à medida que o pH e a força iónica no meio aumentam. Os dois parâmetros afetam a composição química da superfície e consequentemente, a carga de superfície eletrostática das partículas. Sob estas condições, as partículas de magnetite são formadas através da agregação das partículas primárias formadas dentro de um gel de $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Esta é uma agregação ordenada que dá origem a partículas cristalinas esféricas [2]. Uma microestrutura típica de nanopartículas magnéticas produzidas por este método está mostrada na Figura 4.

Modificações deste método permitem a síntese na presença de dextrano ou qualquer outra substância que torna as nanopartículas magnéticas biocompatíveis e, assim, tornar este método especialmente adequado para aplicações *in vivo*. Na verdade, este é o método mais comum usado para obter os agentes de contraste de RMN comerciais baseados em nanopartículas magnéticas [2].

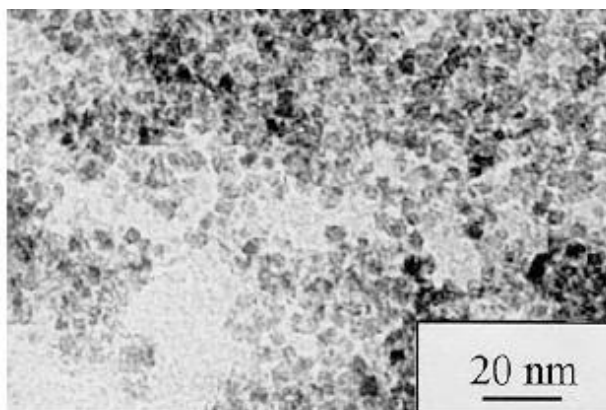


Figura 4 - Solução de nanopartículas magnéticas de maguemite preparadas por co-precipitação [2].

1.3.2. Microemulsão

As microemulsões de água-em-‘óleo’ são meios líquidos transparentes, isotrópicos e termodinamicamente estáveis. Nestes sistemas, as microgotículas da fase aquosa estão presas dentro de conjuntos de moléculas tensioativas dispersas numa fase de óleo contínua. As microcavidades estabilizadas com agentes tensioativos (geralmente no intervalo de 10 nm) proporcionam um efeito de confinamento que limita a nucleação das partículas, o crescimento e a aglomeração. As microemulsões têm-se mostrado um método adequado, versátil e simples de preparar partículas manométricas [2].

Foi já usado sulfato dodecil ferroso, $\text{Fe}(\text{DS})_2$, em solução micelar, para a produção de partículas magnéticas nanométricas, cujo tamanho é controlado pela concentração de surfactante e pela temperatura (figura 5).

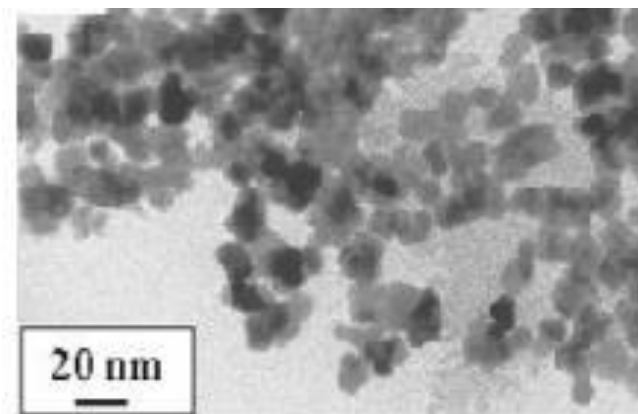


Figura 5 – Solução de nanopartículas magnéticas de maguemite por microemulsões [2].

Foram também sintetizadas, por este método de síntese, nanopartículas de magnetite, com cerca de 4 nm de diâmetro, por hidrólise controlada com hidróxido de amónio e soluções aquosas de FeCl_2 e FeCl_3 dentro das micelas invertidas geradas pela utilização de um tensioativo como AOT e heptano como fase contínua de óleo [2].

1.3.3. Método Sol-Gel

Entre os vários métodos de síntese química de óxidos metálicos, o processo de sol-gel oferece diversas vantagens sobre os outros métodos, incluindo uma boa homogeneidade, baixo custo e alta pureza. Recentemente, o método de sol-gel foi desenvolvido para a preparação de nanopartículas de magnetite utilizando precursores metalorgânicos. Embora seja conseguida a produção de magnetite com tamanhos uniformes e altamente cristalina, através de processos sintéticos como os anteriormente mencionados, não podem ser aplicados a grande escala e nem podem ser considerados como uma produção económica, porque exigem reagentes dispendiosos e muitas vezes tóxicos com complicados passos de síntese [28].

Neste método, o estado cristalino vai ser obtido mediante o tratamento térmico do gel. O controlo sobre as características e a estrutura do gel pode ser facilmente obtido através da fixação das condições da hidroxilação e condensação, bem como a cinética do processo de crescimento. Em particular, o pH, a temperatura, a natureza e concentração dos precursores de sais, bem como a natureza do solvente tem sido descritos como influentes no processo de síntese [28].

Nanopartículas de CaFe_2O_4 foram sintetizadas convenientemente pela técnica de sol-gel. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) foram utilizados como reagentes de partida. A razão molar dos nitratos e ácido cítrico foi mantida 1:1. A solução da mistura foi aquecida lentamente a 90 °C, com agitação constante, para ser transformada num xerogel. O aquecimento adicional resultou na queima do gel formando um pó solto [29].

Este método foi também utilizado neste projeto, no entanto, a análise profunda dos resultados não avançou pois primordialmente as nanopartículas não reagiram a aplicação do campo magnético externo.

1.4. Funcionalização da Superfície

Na preparação e armazenamento de ferrofluidos, a estabilidade é de extrema importância. Alguns compostos são frequentemente utilizados para passivar a superfície das NPs de óxido de ferro durante ou após o processo de preparação, com o objetivo de evitar a aglomeração das mesmas. O facto das NPs de óxido de ferro terem superfícies hidrofóbicas com uma grande relação de área de superfície/volume, no caso da ausência de qualquer revestimento de superfície adequado, e existirem interações hidrofóbicas entre as NPs fará com que ocorra a agregação e formação de grandes aglomerados, o que resulta num aumento do tamanho das partículas. Além disso, com o objetivo de expandir o projeto de aplicação biológica das NPs de óxido de ferro, algumas biomoléculas são também utilizadas para melhorar a sua biocompatibilidade [30].

Para tal efeito, podem ser utilizadas pequenas moléculas e surfactantes, tais como ácidos gordos (moléculas que permitem que as NPs sejam solúveis em “óleo”), sais de amónio (moléculas que permitem que as NPs sejam solúveis em água) [30].

Embora a maioria dos estudos se têm centrado no desenvolvimento de revestimentos por moléculas orgânicas pequenas e surfactantes, as NPs de óxido de ferro funcionalizadas por polímeros estão a receber cada vez mais atenção, devido à vantagem de conferir um aumento das forças de repulsão para equilibrar as forças de atração magnética e de *van der Waals* que atuam sobre as NPs. Dextrano e polietilenoglicol (PEG) são exemplos de dois polímeros para funcionalização de NPs de óxido de ferro [30].

Várias moléculas biológicas, tais como proteínas [31, 32], polipeptídeos [33], anticorpos [34, 35], a biotina e avidina [36], etc., podem também ser ligadas à superfície de NPs de óxido de ferro direta ou indiretamente por acoplamento químico, através de alguns grupos funcionais

terminais. A funcionalização das NPs de óxido de ferro com moléculas biológicas melhora, efetivamente, a biocompatibilidade das partículas. Tais NPs magnéticas podem ser muito úteis para auxiliar a separação efetiva de proteínas, DNA, células, produtos bioquímicos, etc [30].

2. Lipossomas

2.1. Constituição e características estruturais

Quando determinados lípidos estão dispersos em água eles tendem a criar uma estrutura fechada com um ambiente interno aquoso circundado por uma bicamada lipídica, estes pequenos vesículos de forma esférica são chamados lipossomas (figura 6) [37].

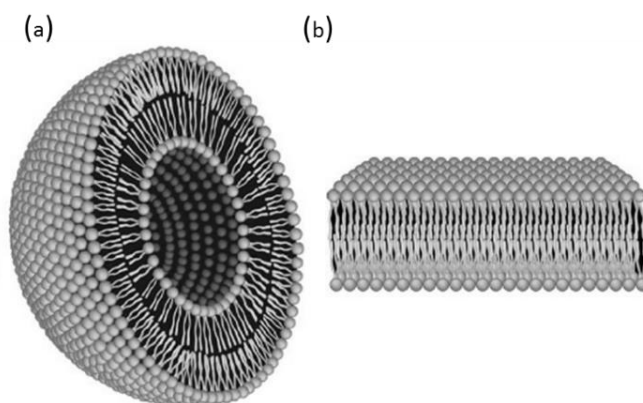


Figura 6 - Imagem da estrutura (em corte) de um lipossoma visto de lado; (b) bicamada lipídica [38].

Os vesículos são constituídos principalmente por fosfolípidos, moléculas anfifílicas, (principal constituinte da membrana celular), que apresentam uma cabeça polar ou hidrofílica (que possui afinidade por água) e uma cauda apolar ou hidrofóbica (que repele moléculas de água) [39]. Para além de fosfolípidos os lipossomas podem ser constituídos por colesterol, tensioativos não tóxicos, esfingolípidos, glicolípidos, ácidos gordos de cadeia longa e proteínas de membrana [37].

As moléculas anfifílicas apresentam-se com características aniónicas quando a cabeça polar é carregada negativamente ou catiónicas quando carregadas positivamente. Algumas moléculas anfifílicas são não iónicas (neutras) ou possuem grupos zwitteriónicos na cabeça polar, não possuindo nenhuma carga global, ou contêm grupos que são atraídos para a água [40].

Os fosfolípidos são caracterizados por uma temperatura de transição de fase (T_m), na qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia hidrocarbonada do lípido está em estado ordenado, para uma fase líquido-cristalina, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados, apresentando uma membrana mais permeável. O comprimento e a saturação da cadeia lipídica influenciam o valor da T_m [41, 42].

Além disso, a escolha de componentes de bicamada e a sua carga iônica determina a rigidez ou fluidez [43].

A adição de colesterol à bicamada lipídica dos lipossomas diminui a sua permeabilidade e aumenta a sua estabilidade *in vivo* e *in vitro*, porque a presença de colesterol induz uma organização mais densa, estabilizando a bicamada [38].

Portanto, diferentes membranas compostas por lípidos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura (figura 7) [41, 42].

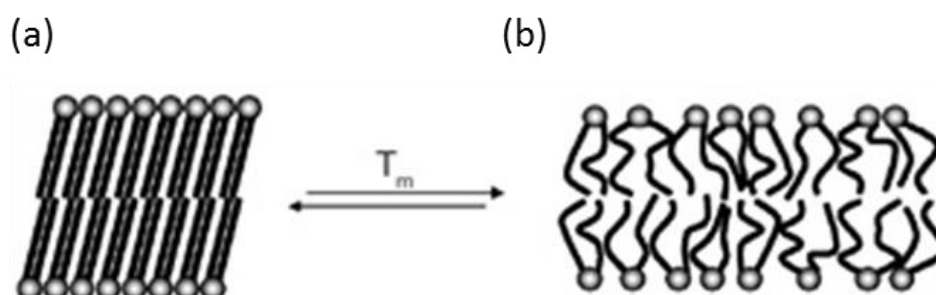


Figura 7 – Esquema ilustrativo das diferentes fases físicas adotadas por uma bicamada lipídica num meio aquoso sob influência de temperatura. Bicamada lipídica: (a) na fase gel, (b) na fase líquido-cristalina (adaptada de [44]).

Com concentrações de lípidos fisiologicamente relevantes (bem acima da concentração micelar crítica) o efeito hidrofóbico e a forma das moléculas anfifílicas definem três entidades estruturais supramoleculares (figura 8). As estruturas globais refletem o empacotamento ideal das moléculas anfifílicas com um mínimo de energia, equilibrando o efeito hidrofóbico e a força repulsiva associada à cabeça da molécula [45].


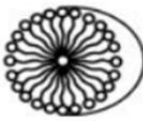

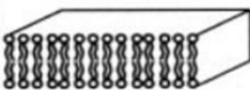

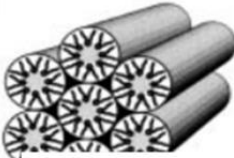
| Espécies Lipídicas | Forma Molecular | Fase Lipídica |
|---|---|---|
| Detergentes Lisofosfolípidos |  Cone invertido |  Micela |
| Fosfatidilcolina Fosfatidilinositol Fosfatidilglicerol Fosfatidilserina Esfingomielina Ácido Fosfatídico |  Cilindro |  Bicamada |
| Fosfatidiletanolamina Ácidos gordos insaturados Ceramida Colesterol |  Cone |  Hexagonal inversa |

Figura 8 - Entidades estruturais resultantes dependendo da forma das moléculas (adaptado de [45]).

Para minimizar interações desfavoráveis, este tipo de moléculas agrega-se espontaneamente, processo conhecido como *self-assembly* (auto-organização), o que dependendo do tipo de moléculas constituintes, conduz à formação de várias estruturas (figura 9).

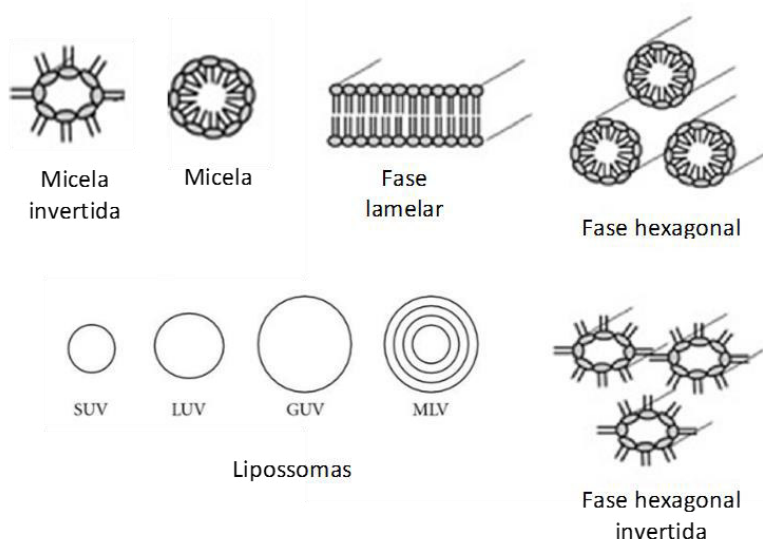


Figura 9 – Representação esquemática das várias formas resultantes da auto-organização de moléculas anfifílicas (adaptada de [46]).

Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelar e multilamelar, respetivamente. Quanto ao tamanho, distingue-se entre vesículas multilamelares (MLV, 0,1-10 μm), e aquelas que podem ser unilamelares pequenas (SUV, *small unilamellar vesicles*, <100 nm), grandes (LUV, *large unilamellar vesicles*, 100-500 nm) ou gigantes (GUV, *giant unilamellar vesicles*, $\sim 1 \mu\text{m}$) [47].

2.2. Aplicações

Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogénicos os lipossomas são amplamente utilizados como veículos de entrega de inúmeras moléculas nas indústrias cosmética e farmacêutica. Além disso, as indústrias alimentar e agrícola têm extensivamente estudado o uso de encapsulamento em lipossomas de compostos instáveis (por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, sabores e elementos bioativos) protegendo a sua funcionalidade.

Os lipossomas podem aprisionar ambos os compostos, hidrofóbicos (inseridos ou adsorvidos na membrana) e hidrofílicos (dirigem-se para o compartimento aquoso), evitando decomposição dos mesmos, ocorrendo a libertação em alvos designados [43].

3. Magnetolipossomas

Os lipossomas podem ser combinados com uma ampla variedade de nanomateriais, como núcleos de óxidos de ferro.

Quando nanopartículas magnéticas são rodeadas por uma bicamada fosfolipídica, utiliza-se frequentemente o termo geral de "magnetolipossomas" (MLs) para designar a estrutura coloidal resultante [48].

3.1. Propriedades

Os MLs clássicos consistem em núcleos de óxido de ferro (~ 15 nm de diâmetro) onde uma bicamada fosfolipídica é imediatamente anexada. Estas partículas não contêm nenhuma cavidade aquosa interna, sendo conhecidas por magnetolipossomas secos ou sólidos (DMLs ou SMLs). Em vez disso, a cavidade interna é totalmente preenchida por um *cluster* de nanopartículas de óxido de ferro. Exibem uma elevada proporção de ferro sobre lipídeo, permitindo a absorção celular destas partículas sem efeitos tóxicos quando uma composição lipídica apropriada é utilizada [49].

Mais tarde, um segundo tipo de MLs foi descrito como vesículas grandes unilamelares (diâmetro que varia de 100 a 500 nm), que englobam várias escalas nanométricas (diâmetro de 1-10 nm) de núcleos de óxido de ferro no seu espaço central aquoso (figura 10) [50]. São conhecidos como magnetolipossomas aquosos (AMLs).

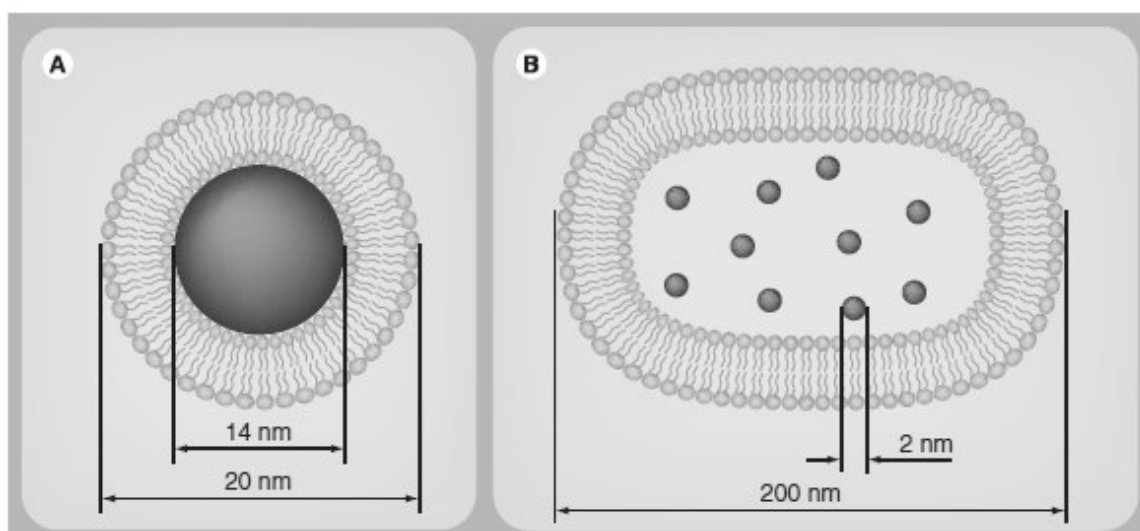


Figura 10 - Magnetolipossomas secos e aquosos sujeitos à extrusão: representação esquemática de (A) magnetolipossomas clássicos e (B) magnetolipossomas sujeitos à extrusão com as indicações do tamanho adequadas [50].

Geralmente, o último tipo de partículas é preparado pelas técnicas de extrusão ou injeção. Este tipo de MLs tem a vantagem de que o tamanho dos lipossomas pode ser modulado de forma fácil e que, para além dos núcleos de nanopartículas, as moléculas hidrófilas podem ser também captadas no espaço aquoso interno. O tamanho mais pequeno dos núcleos de óxido de ferro, no entanto, pode conduzir a propriedades magnéticas menos pronunciadas do que no caso dos MLs clássicos [48].

3.2. Aplicações

3.2.1. MLs na biotecnologia

Os núcleos de óxido de ferro ferromagnéticos utilizados para gerar MLs muitas vezes são peptizados, por exemplo, com moléculas de laurato que impedem a agregação, sendo assim possível obter suspensões aquosas de núcleos de óxido de ferro estáveis [51].

MLs sólidos ou secos, nos quais a bicamada lipídica está ligada diretamente à magnetite (Fe_3O_4) central, têm sido utilizados para a imobilização de enzimas intrínsecas ligadas à membrana, conduzindo à formação dos chamados magnetoproteolipossomas. Um complexo enzima-ML foi então utilizado como biocatalisador em biorreatores magneticamente controlados [48]. MLs sólidos também foram utilizados para auxiliar nas estratégias de purificação. Por exemplo, MLs contendo alvos fosfolipídicos têm sido utilizados para a detecção e isolamento de anticorpos a partir de soros antifosfolipídicos humanos [52, 53]. Alternativamente, podem ser MLs com a superfície modificada para permitir a ligação com imunoglobulinas IgG e de IgE, que é útil para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade em indivíduos com alergias respiratórias [54].

3.2.2. MLs na biomedicina

3.2.2.1. MLs como agentes de contraste em MRI

Na investigação biomédica, a imagem não invasiva tornou-se uma ferramenta cada vez mais importante a longo prazo quando se trata de estudos *in vivo*, por exemplo, no acompanhamento da migração de células estaminais, do desenvolvimento do tumor, da eficácia da terapia do cancro ou da expressão de genes repórter [55]. Entre todos os métodos de imagem não invasivos, a imagem por ressonância magnética (MRI) oferece várias vantagens, tais como a falta de isótopos que irradiam, uma resolução espacial elevada e um excelente contraste de tecido mole, permitindo a geração de uma imagem anatômica definida. Apesar destas vantagens excelentes, a MRI é ainda limitada pela sua baixa sensibilidade inerente [56].

A técnica mede as mudanças na magnetização dos prótons de hidrogénio nas moléculas de água, assentando num campo magnético, após um pulso de radiofrequências tê-lo atingido.

Protões de diferentes tecidos reagem de forma diferente, dando uma imagem das estruturas anatómicas. Estas imagens podem ser melhoradas adicionando “agentes de contraste”, que realçam o contraste, afetando o comportamento dos protões na sua proximidade [57].

No caso da migração de células estaminais, é exigida a marcação *in vitro* de células com agentes de contraste, tais como nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) antes da sua transplantação *in vivo*. As IONPs têm sido amplamente utilizadas como agentes de contraste negativos celulares de MRI, mesmo em cenários clínicos, devido ao seu elevado momento magnético, o qual aumenta o relaxamento transversal de protões de água circundantes, resultando num efeito de escurecimento das amostras marcadas [55].

3.2.2.2. MLs como transportadores de fármacos

É bastante evidente que dois marcos importantes no sucesso do tratamento do cancro seriam uma orientação eficaz do fármaco, sem comprometer o seu tempo de permanência no sangue, e suprimindo mecanismos relacionados ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Exatamente por essas razões, a investigação está focada em novas estratégias de orientação eficaz e de forma a evitar a resistência aos medicamentos, mantendo a concentração do fármaco tão baixa quanto possível. Para esse efeito, em conjunto com os avanços contínuos na biologia molecular (isto é, as vias moleculares para onde o fármaco se deveria dirigir), rotas físicas podem ser empregues, tais como a orientação magnética e hipertermia magnética, através de nanotransportadores magnéticos de fármacos. Com o auxílio de campos magnéticos externos, a orientação dos nanotransportadores pode ser realizada, sem ter de utilizar um excesso de agentes de direcionamento molecular [58].

Utilizando estratégias já descritas, verificou-se que, quando um ligando específico está acoplado a MLs, estes complexos carregados de fármaco fornecem ao local alvo uma grande carga de fármaco sem provocar toxicidade para o tecido vizinho associado [48].

MLs, quer secos quer aquosos, podem hospedar fármacos hidrofílicos bem como hidrofóbicos. As últimas moléculas facilmente se distribuem na bicamada lipídica de qualquer tipo de ML. Para transportar fármacos polares, MLs aquosos são a principal escolha, porque os fármacos podem ser facilmente encapsulados na cavidade aquosa interna durante a preparação dos MLs. Os MLs secos não têm um espaço aquoso e, por conseguinte, exigem uma pré-hidrofobização dos fármacos [48].

Em relação ao direcionamento do fármaco ao tecido alvo, a presença do núcleo magnético em MLs pode oferecer vantagens inequívocas. Foi já demonstrado que após a administração intravenosa, o núcleo magnético dos MLs pode ser usado para alvejar estericamente tumores *in vivo*, através da utilização de um magneto extracorporal e, como tal, as nanopartículas orientam-se para o local de entrega [59].

Uma vez que o complexo de fármaco-ML atinja o local desejado de libertação do fármaco, esta pode ser desencadeada e facilitada por meio de estratégias engenhosas, tais como o aumento da temperatura local, combinados com a utilização de MLs termossensíveis. Semelhante ao caso dos lipossomas termossensíveis, a libertação do fármaco pode ser controlada pela temperatura quando se utilizam formulações lipídicas sintéticas que têm temperaturas de transição de fase gel para a fase líquido-cristalina, que são um pouco acima da temperatura fisiológica das espécies e abaixo do limite de hipertermia. Além disso, foi levantada a hipótese que o aumento da temperatura pode ativar pré-fármacos encapsulados antes da sua libertação [48].

Surpreendentemente, há indícios que MLs *in vivo*, são melhores no que diz respeito a atingir o alvo e mostraram uma maior potência no tratamento de cancro da mama, assim como os lipossomas contendo paclitaxel. Os autores postulam que o fármaco é libertado de forma mais gradual e menos abrupto devido à presença do núcleo de óxido de ferro, que permite estabilizar a formulação (figura 11) [48].

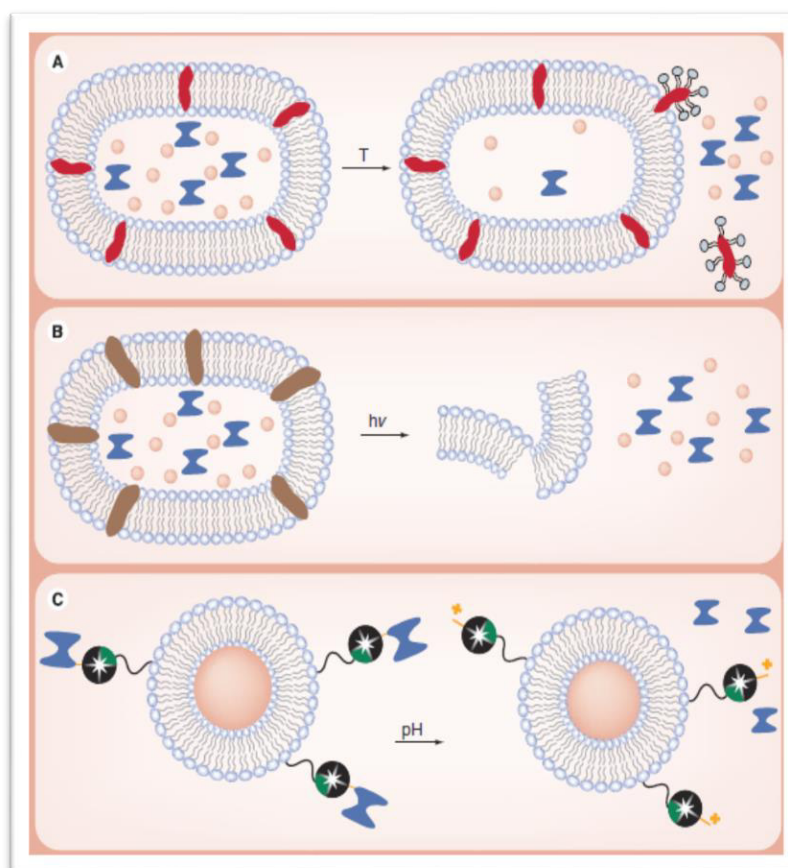


Figura 11 - Representação esquemática de diferentes estratégias que podem levar à liberação específica e controlada de medicamentos (A) aumento das temperaturas conduzem a uma membrana mais fluida em lipossomas termossensíveis, permitindo liberação da droga (azul). (B) A radiação específica no infravermelho pode destruir fulereno (castanho) presente nas membranas, permitindo a liberação da droga (C), um pH mais baixo, por exemplo, presentes perto do tecido cancerígeno ou dentro dos lisossomas celulares pode quebrar ligações (laranja) entre o fármaco e a nanopartícula, resultando na liberação do fármaco [48].

3.2.2.3. MLs como mediadores no tratamento por hipertermia

A hipertermia, ou o aquecimento controlado do tecido para promover a necrose celular, com nanopartículas magnéticas foi demonstrado ser um tratamento potente contra o cancro. Magnetolipossomas são particularmente úteis para a hipertermia, porque as propriedades de bicamada lipídica são altamente dependentes da temperatura [60].

Dependendo da intensidade e da frequência do campo, a quantidade de calor produzido pode ser regulada. Quando estas partículas estão no interior das células tumorais, o aumento de temperatura pode provocar a morte das células e são, assim, úteis numa estratégia anticancerígena. Quando as temperaturas são elevadas a 41-46 °C, refere-se a uma hipertermia ligeira, que podem estimular a resposta imune não específica para a imunoterapia de cancros. A termoablação ocorre quando a temperatura está acima de 46 °C, o que leva a uma necrose

celular direta. Para proporcionar uma potente terapia, é imperativo uma entrega específica das partículas às células tumorais sem danificar o tecido circundante saudável [48].

O direcionamento de MLs catiónicos em hipertermia foi ainda demonstrado pelo grupo de pesquisa de Kobayashi em vários modelos de tumores animais (figura 12) [48].

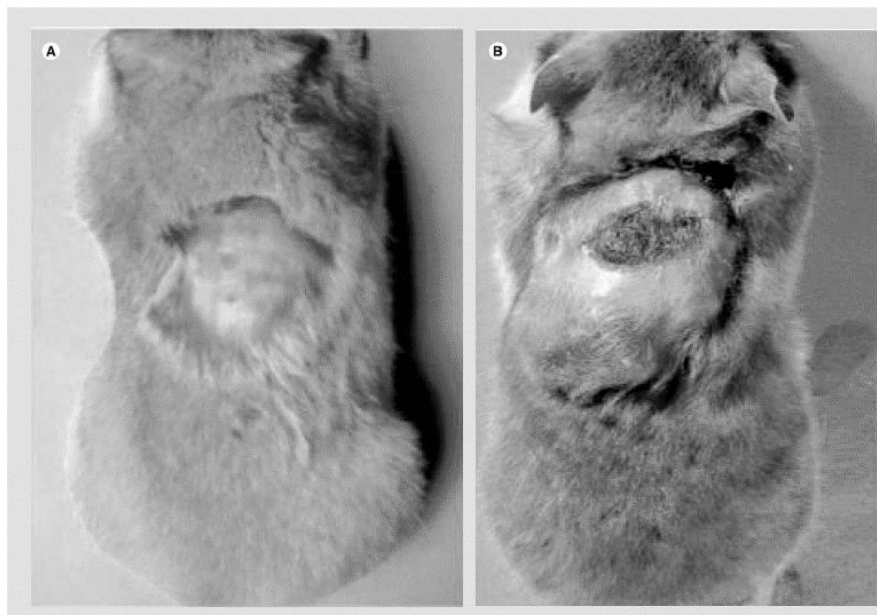


Figura 12 - Efeito de hipertermia magnética induzida na redução do tamanho do tumor. Fotografias típicas de hamsters no dia 20 após a injeção da solução de magnetolipossomas catiónicos. Estas imagens mostram um hamster do grupo de tratamento (A) e um do grupo controlo (B) [48].

4. Referências do capítulo I

- [1] A. Akbarzadeh, M. Samiei, and S. Davaran, Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine, *Nanoscale Research Letters*, 7 (2012) 1-13.
- [2] P. Tartaj, et al., The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36 (2003) 182-197.
- [3] M. Colombo, et al., Biological applications of magnetic nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 4306–4334.
- [4] N.H. Sulaiman, et al., Superparamagnetic calcium ferrite nanoparticles synthesized using a simple solgel method for targeted drug delivery, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 26 (2015) 103-110.
- [5] S.K. Morcos, Nephrogenic systemic fibrosis following the administration of extracellular gadolinium based contrast agents: is the stability of the contrast agent molecule an important factor in the pathogenesis of this condition?, *The British Institute of Radiology*, 80 (2007) 73-76.
- [6] H. Ersoy and F.J. Rybicki, Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 26 (2007) 1190-1197.
- [7] C. Thakral, J. Alhariri, and J.L. Abraham, Long-term retention of gadolinium in tissues from nephrogenic systemic fibrosis patient after multiple gadoliniumenhanced MRI scans: case report and implications, *Contrast Media Mol Imaging*, 2 (2007) 199-205.
- [8] L. L. Muldoon, et al., Imaging, distribution, and toxicity of superparamagnetic iron oxide magnetic resonance nanoparticles in the rat brain and intracerebral tumor, *Neurosurgery*, 57 (2005) 785-796.
- [9] S. M. Moghimi, A.C. Hunter, and J.C. Murray., Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol Rev*, 53 (2001) 283-318.
- [10] D. E. Sosnovik, M. Nahrendorf, and R. Weissleder, Molecular Magnetic Resonance Imaging in Cardiovascular Medicine, *Circulation*, 115 (2007) 2076-2086.
- [11] S. G. Grancharov, et al., Bio-functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles and Their Use as Biomolecular Labels in a Magnetic Tunnel Junction Based Sensor, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109 (2005) 13030-13035.

- [12] S. Laurent, et al., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications, *Chemical Reviews*, 106 (2008) 2064-2110.
- [13] C. Sun, J. S.H. Lee, and M. Zhanga, Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (2008) 1252-1265.
- [14] L. H. Reddy, J.N. J. L. Arias, and P. Couvreur, Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Chemical Reviews*, 112 (2012) 5818-5878.
- [15] A. K. Gupta and M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26 (2005) 3995-4021.
- [16] J. D. G. Durán, et al., Magnetic colloids as drug vehicles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (2008) 2948–2983.
- [17] S.P. Gubin, Magnetic Nanoparticles, *Wiley-VCH*, 1ª edição, (2009) 13-17.
- [18] D. S. Mathew and R. S. Juang, An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions, *Chemical Engineering Journal*, 129 (2007) 51-65.
- [19] C. Liu, A. J. Rondinone, and Z. J. Zhang, Synthesis of magnetic spinel ferrite CoFe_2O_4 nanoparticles from ferric salt and characterization of the size-dependent superparamagnetic properties, *Pure Appl. Chem*, 72 (2000) 37-45.
- [20] C. J. O'Connor, et al., Ferrite synthesis in microstructured media: Template effects and magnetic properties, *J. Appl. Phys*, 81 (1997) 4741-4743.
- [21] L. J. Berchmans, et al., A rapid one-step mechanosynthesis and characterization of nanocrystalline CaFe_2O_4 with orthorhombic structure, *J. Alloys Compd.*, 500 (2010) 68-73.
- [22] N. H. Sulaiman, et al., Superparamagnetic calcium ferrite nanoparticles synthesized using a simple solgel method for targeted drug delivery, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 26 (2015) 103-110.
- [23] A. Samariya, et al., Size dependent structural and magnetic behaviour of CaFe_2O_4 *Current Applied Physics*, 13 (2013) 830-835.
- [24] R. E. Rosensweig, Heating magnetic fluid with alternating magnetic field, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 252, (2002) 370-374.
- [25] M. F. Bellin, MR contrast agents, the old and the new, *European Journal of Radiology*, 60 (2006) 314-323.
- [26] M.G. Harisinghani, et al., MRI Contrast Agents for Evaluating Focal Hepatic Lesions, *Clinical Radiology*, 56 (2001) 714-725.

- [27] S. Sun , et al., Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) nanoparticles, *J Am Chem Soc.*, 126 (2004) 273-279.
- [28] J. Xu, et al., Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol–gel method, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 309 (2007) 307-311.
- [29] A. Samariya, et al., Size dependent structural and magnetic behaviour of $CaFe_2O_4$, *Current Applied Physics*, 13 (2013) 830-835.
- [30] W. Wu, Q. He, and C. Jiang, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Res Lett*, 3 (2008) 397-415.
- [31] H. Han-wei, et al., Characteristics of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles encapsulated with human serum albumin, *Journal of Central South University of Technology*, 13 (2006) 6-11.
- [32] M. Mikhaylova, et al., BSA Immobilization on Amine-Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, *Chem. Mater.*, 16 (2004) 2344–2354.
- [33] M. Lewin, et al., Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells., *Nat. Biotechnol.*, 18 (2000) 410-414.
- [34] L. X. Tiefenauer, G. Kuehne, and R.Y. Andres, Antibody-magnetite nanoparticles: in vitro characterization of a potential tumor-specific contrast agent for magnetic resonance imaging, *Bioconjugate chemistry*, 4 (1993) 347-352.
- [35] J. M. Nam, S.I. Stoeva, and C.A. Mirkin, Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 5932-5933.
- [36] Y. Weizmann, et al., Magneto-mechanical detection of nucleic acids and telomerase activity in cancer cells., *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 1073-1080.
- [37] A. Samad, Y. Sultana, and M. Aqil, Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review, *Current Drug Delivery*, 4 (2007) 297-305.
- [38] G. Bozzuto and A. Molinari, Liposomes as nanomedical devices, *Int J Nanomedicine.*, 10 (2015) 975-999.
- [39] S. Vemuri and C. T. Rhodes, Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review, *Pharm. Acta Helvetica*, 70 (1995) 95-111.
- [40] J. Eastoe and R. F. Tabor, Surfactants and Nanoscience, *Colloidal Foundations of Nanoscience*, 6 (2014) 135-157.
- [41] F. Frézard, et al., Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy, *Quim. Nova*, 28 (2005) 511-518.
- [42] D. D. LASIC, Novel applications of liposomes, *Trends Biotechnol.*, 16 (1998) 307-320.
- [43] A. Akbarzadeh, et al., Liposome: classification, preparation, and applications., *Nanoscale Res Lett.*, 8 (2013) 1-9.

- [44] M. Eeman, and M. Deleu, From biological membranes to biomimetic model membranes, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14 (2010) 719-736
- [45] K. Simons, and J.L. Sampaio, Membrane organization and lipid rafts, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3 (2011) 1-17.
- [46] N. Wauthoz, and K. Amighi, Phospholipids in pulmonary drug delivery, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 116 (2014) 1-15.
- [47] A. S. Ulrich, Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles, *Bioscience Reports*, 22 (2002) 129-150.
- [48] S. J. Soenen, M. Hodenius and M. D. Cuyper, Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine, *Nanomedicine*, 4 (2009) 177-191.
- [49] S. J. H. Soenen, J. Baert and M. D. Cuyper, Optimal conditions for labelling of 3T3 fibroblasts with magnetoliposomes without affecting cellular viability, *Chembiochem*, 8 (2007) 2067-2077.
- [50] M. S. Martina, J. P. Fortin and C. Ménager, Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging, *J Am Chem Soc.*, 127 (2005) 10676-10685.
- [51] D. Thorek, et al., Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging, *Ann. Biomed. Eng.*, 34 (2006) 23-28.
- [52] F. M. Rocha, et al., Preparation and characterization of affinity magnetoliposomes useful for the detection of antiphospholipid antibodies, *J. Magn. Magn. Mater.*, 225 (2001) 101-108.
- [53] S. C. D. Pinho, R. L. Zollner, and M. D. Cuyper, Adsorption of antiphospholipid antibodies on affinity magnetoliposomes, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 63 (2008) 249-253.
- [54] F. Martins, et al., Surface-modified magnetic colloids for affinity adsorption of immunoglobulins, *J. Magn. Magn. Mater.*, 320 (2008) 1876-1870.
- [55] S. J. Soenen, et al., MRI assessment of blood outgrowth endothelial cell homing using cationic magnetoliposomes, *Biomaterials*, 32 (2011) 4140-4150.
- [56] C. F. Geraldes and S. Laurent, Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging, *Contrast Media Mol Imaging*, 4 (2009) 1-23.
- [57] C. Lok, Picture perfect, *Nature*, 412 (2001) 372-374.
- [58] A. Bakandritsos, A.G. Fatourou and D.G. Fatouros, Magnetoliposomes and their potential in the intelligent drug-delivery field, *Therapeutic Delivery*, 3 (2012) 149-1482.
- [59] J. P. F. Ripoche, M. S. Martina and F. Gazau, Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: feasibility., *Radiology*, 239 (2006) 514-524.

[60] M. Gonzales and K. M. Krishnan, Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293 (2005) 265-270.

CAPÍTULO II - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

1. Espectroscopia

A radiação eletromagnética é uma das vertentes mais importantes para caracterizar a estrutura e a dinâmica da matéria. A absorção da radiação ultravioleta, visível, infravermelho e radiação de microondas fornece informações detalhadas sobre os níveis de energia eletrônicos, vibracionais, e de rotação das moléculas e tem, em alguns casos permitido a investigadores determinar a estrutura de moléculas complexas.

1.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis

1.1.1. Princípios básicos

Na espectroscopia eletrônica os elétrons são transferidos de orbitais atômicas ou moleculares de baixa energia para alta energia quando o material é irradiado com luz [1].

A diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental (ΔE) irá corresponder a uma certa frequência (ν) ou comprimento de onda de radiação eletromagnética, e isto dependerá do tipo de transição (e, portanto, a separação entre os níveis de energia). a relação entre a energia de uma transição e a frequência é dada pela equação 1:

$$\Delta E = h\nu \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck (6.62×10^{-34} Js) [2, 3].

O espectro eletromagnético é dividido em certo número de regiões. Na figura 1 são mostrados os nomes dessas regiões e as transições atômicas/moleculares associadas, juntamente com as frequências e os comprimentos de onda.



Figura 1 - Representação do espectro eletromagnético (adaptado de [2]).

Podemos ver que as transições nucleares de ressonância magnética (RMN), que correspondem aos comprimentos de onda na região de onda de rádio do espectro, são aqueles com a menor diferença entre os níveis de energia, e transições eletrônicas na região do ultravioleta-visível tem a maior diferença de energia entre níveis de transição. A região de UV-Vis é importante, uma vez que as absorções na região (200-800 nm) dão origem à cor associada com as moléculas (figura 2) [2].

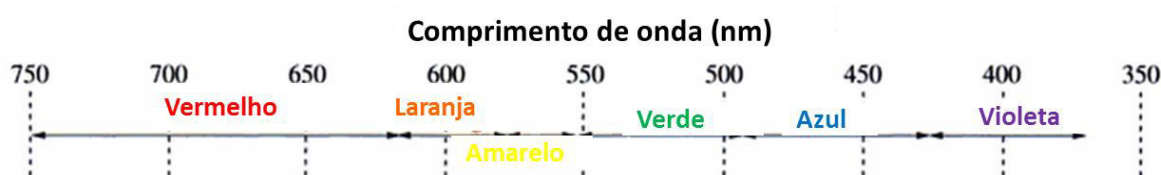


Figura 2 – Espectro eletromagnético na região do UV- visível (adaptado de [2]).

Existem muitos grupos que absorvem abaixo dos 200 nm, mas esta parte do espectro é difícil de examinar (o oxigênio absorve radiação UV inferior a 200 nm), a menos que os espectros sejam registados em vácuo [2].

1.1.2. Lei de Lambert-Beer

A absorção de luz UV (200 nm-400 nm; 595-299 kJ mol⁻¹) ou de luz visível (400nm-800nm; 299-149 kJ mol⁻¹) por parte de moléculas orgânicas pode resultar na promoção de elétrons externos de um nível de energia eletrônica para um superior. A diferença entre os níveis de energia eletrônicos é maior do que a diferença entre quaisquer outros níveis de energia molecular, de modo que essas transições exigem uma maior energia de radiação de onda curta.

A promoção entre outros níveis de energia, ou seja, vibracional ou rotacional, requer apenas radiação infravermelha, energia mais baixa (vibracional) ou radiação de microondas (rotacional) (figura 3) [2].

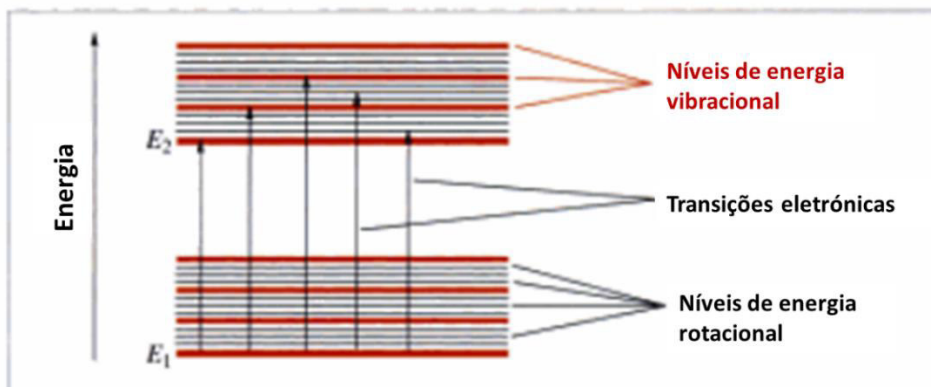


Figura 3 - Diagrama esquemático mostrando as possíveis transições eletrônicas moleculares, e os níveis de energia vibracional e rotacional (adaptado de [2]).

À temperatura ambiente, a maioria das moléculas estão no estado de menor energia vibracional do nível mais baixo de energia eletrônica, o estado fundamental (E_1). A absorção de UV ou luz visível leva a promoção de um elétron de E_1 para o nível eletrônico excitado, E_2 . A transição eletrônica é acompanhada por transições vibracionais e rotacionais, de modo que a promoção de um elétron possa ocorrer a partir do nível de energia eletrônico estado fundamental de E_1 , para qualquer um dos níveis de energia de vibração ou de rotação de E_2 [2].

Isso explica por que é que as bandas de absorção de UV-Vis são caracteristicamente amplas, embora as transições de energia entre os níveis de energia rotacional e vibracional dentro de um nível de energia eletrônico possam mostrar estrutura fina. Estrutura fina em espectros de UV, por vezes, pode ser conseguida usando um solvente que tem pouca interação com as moléculas da amostra. O facto é que há muitas transições eletrônicas possíveis, no entanto, não significa que elas possam ou vão ocorrer. Basicamente, transições eletrônicas são permitidas se a orientação do spin do elétron não mudar durante a transição e se a simetria das funções iniciais e finais for diferente; estas são chamadas as regras de seleção por rotação e simetria, respetivamente. No entanto, as chamadas “transições proibidas” podem ainda ocorrer, mas dão origem a absorções fracas [2].

De acordo com a lei de Lambert-Beer, a absorvância, A , de uma solução é diretamente proporcional ao comprimento do percurso (l , comprimento da célula que contém as soluções,

em cm) e à concentração da molécula de absorção (c, em moles por litro), de acordo com a equação 2,

$$A = \epsilon cl \quad (2)$$

em que ϵ , a absortividade molar da molécula, por vezes chamado o coeficiente de absorção molar, é característico da molécula. A absortividade molar é normalmente expressa em unidades de $100 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, contudo é cada vez mais comum utilizarem-se as unidades $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A absortividade molar, ϵ , é uma medida da intensidade da absorção e, geralmente, varia de 0 a 10^6 . A maior probabilidade de uma absorção particular e sua transição eletrónica associada, reflete-se num maior valor de ϵ para essa transição [2].

1.1.3. Espectrofotómetro

Existem espectrofotómetros básicos que medem a absorvância a um comprimento de onda específico, definido pelo utilizador, e outros, que podem verificar toda a gama de UV-visível. Espectrofotómetros mais recentes são geralmente controlados por computador e permitem ao utilizador uma maior flexibilidade, por exemplo, em sobrepor os espectros de uma mistura de reação ao longo do tempo, ou a construção de uma curva de calibração para determinar a concentração de um desconhecido [2].

Espectrofotómetros de UV-VIS de feixe único funcionam segundo os mesmos princípios gerais, mas medem a absorção da referência em primeiro lugar, seguido pela amostra, que pode varrer ao longo de toda a gama dos UV-Vis ou pode ser utilizado num único comprimento de onda [2].

No espectrofotómetro de feixe duplo a luz é dividida em dois feixes paralelos, cada um dos quais atravessa uma célula; uma célula contém a amostra dissolvida em solvente e a outra célula contém o solvente sozinho. O detetor mede a intensidade da luz transmitida através do solvente sozinho (I_0) e compara-a com a intensidade da luz transmitida através da célula de amostra (I). A absorvância, A , é então calculada a partir da relação mostrada na equação 3,

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

Num laboratório de ensino é utilizado geralmente o espectrofotômetro de feixe duplo. No que diz respeito à sua constituição existem uma fonte de radiação, monocromador (reflete e divide a luz branca policromática), duas células (onde se encontra a amostra a analisar e a amostra referência), e um detetor (a luz é convertida num sinal elétrico pelo fotomultiplicador) para medir a quantidade de luz que passa através das células (figura 4) [2].

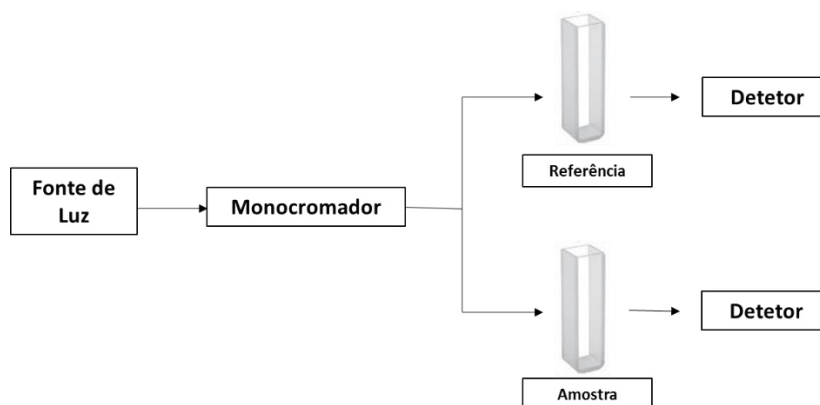


Figura 4 – Esquema representativo de um espectrofotômetro de feixe duplo.

1.2. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é considerada uma das ferramentas principais na investigação em bioquímica e biofísica. A técnica de detecção de fluorescência é altamente sensível, requer baixos custos e impede a dificuldade de lidar com marcadores radioativos. Houve um crescimento dramático do uso de imagiologia por fluorescência celular e molecular. A imagiologia por fluorescência pode revelar a localização e as medições de moléculas intracelulares, por vezes, ao nível de detecção de moléculas individuais [4].

A luminescência é a emissão de luz de qualquer substância, e ocorre a partir dos estados eletronicamente excitados. Este fenómeno é formalmente dividido em duas categorias, a fluorescência e a fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. No estado excitado singleto, em que os spins opostos dos eletrões são conservados, o retorno ao estado fundamental é uma transição permitida e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. As taxas de emissão de fluorescência são tipicamente 10^8 s^{-1} , de modo que um tempo de vida de fluorescência típico, (τ), ou seja, tempo médio entre a sua excitação até voltar ao estado fundamental, é perto de 10 ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$) [4].

A fosforescência é a emissão de luz de estados tripleto excitado onde a orientação dos spins dos elétrons de valência é a mesma quer no estado fundamental quer no estado excitado. Transições para o estado fundamental são proibidas e as taxas de emissão são lentas (10^3 - 10^0 s⁻¹), de modo que o tempo de vida da fosforescência é tipicamente na ordem dos segundos [4].

1.2.1. Diagrama de Jablonski

Os processos que ocorrem entre a absorção e emissão de luz são geralmente ilustrados pelo diagrama de Jablonski (figura 5).

O estado eletrônico fundamental e o primeiro e segundo estados excitados singleto estão representados por S_0 , S_1 e S_2 , respetivamente. Em cada um destes níveis de energia eletrónicos, os fluoróforos podem existir sob um certo número de níveis de energia vibracionais, representados por 0, 1, 2, etc. neste diagrama de Jablonski. As transições entre estados são mostradas com linhas verticais para ilustrar a natureza instantânea da absorção de luz [4].

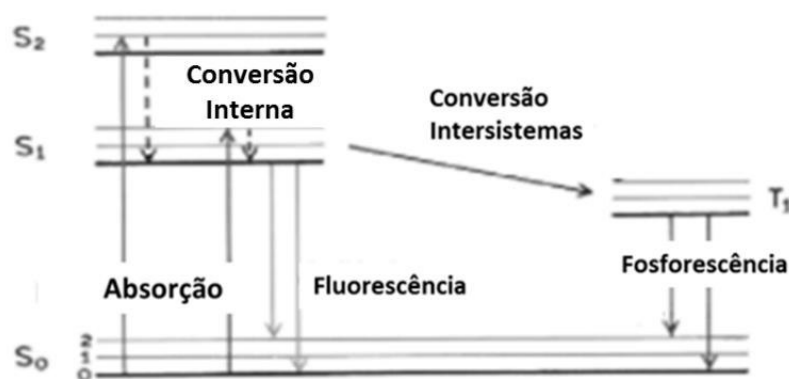


Figura 5 – Diagrama de Jablonski (adaptado de [4])

Posteriormente à absorção de luz, normalmente ocorrem diversos processos. Um fluoróforo é geralmente excitado para o nível de vibração mais elevado do estado eletrônico S_1 ou S_2 . Com algumas raras exceções, as moléculas em fases condensadas relaxam rapidamente para o nível mais baixo de vibração do S_1 . Este processo é chamado de conversão interna e, geralmente, ocorre dentro de 10^{-12} s ou menos. Uma vez que o tempo de vida da fluorescência é tipicamente perto 10^{-8} s, a conversão interna é geralmente completada antes da emissão. Daí, a emissão de fluorescência resulta geralmente a partir de um estado excitado termicamente equilibrado, que é o mais baixo estado de energia vibracional de S_1 . Voltar ao estado

fundamental normalmente ocorre de um nível superior excitado para o nível vibracional do estado fundamental, que, em seguida, rapidamente (10^{-12} s) atinge o equilíbrio térmico. O regresso dá-se para estados vibracionais excitados de S_0 [4].

Moléculas no estado S_1 podem também passar por uma conversão de spin para o estado tripleto (T_1). A emissão de T_1 é denominada fosforescência, como anteriormente já falado, e geralmente é deslocada para comprimentos de onda mais longos (energias inferiores) relativos à fluorescência. Conversão de S_1 para T_1 é chamada conversão intersistemas. A transição de T_1 para o estado fundamental singleto é proibida e, como resultado, as constantes de velocidade para emissão do estado tripleto são várias ordens de magnitude menores do que—para a fluorescência. Até são possíveis tempos de vida mais longos, como são comprovadas nos brinquedos *glow-in-the-dark* (brilham no escuro). Após a exposição à luz, as substâncias continuam a brilhar por alguns minutos enquanto os fluoróforos excitados retornam ao estado fundamental lentamente. A fosforescência geralmente não é vista em soluções de fluido à temperatura ambiente. Isso acontece porque existem muitos processos de desativação que competem com a emissão, tais como processos de deterioração e extinção não-radiativos [4].

1.2.2. Rendimento quântico de fluorescência

Moléculas no estado fundamental absorvem a luz com uma intensidade igual a I e atingem um estado excitado S_n . Então, diferentes processos competitivos, incluindo fluorescência, irão competir uns com os outros para desexcitar a molécula. A constante de velocidade (k) do estado excitado é a soma das constantes cinéticas dos processos competitivos (eq. 4):

$$k = k_r + k_{isc} + k_{ic} \quad (4)$$

onde k_r é a constante de desexcitação por radiação, k_{isc} constante de desexcitação por conversão intersistemas e k_{ic} constante de desexcitação por conversão interna [3].

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) é a razão entre o número de fótons emitidos de forma radiativa e o número de fótons absorvidos pela molécula (equação 5):

$$\Phi_F = \frac{\text{fótons emitidos}}{\text{fótons absorvidos}} = \frac{k_r}{k_r + k_{isc} + k_i} \quad (5)$$

Por conseguinte, a fim de determinar o rendimento quântico do fluoróforo, primeiro é necessário medir as densidades óticas (OD) das soluções do fluoróforo e da referência no comprimento de onda de excitação, e calcular para cada um deles a soma das suas intensidades de fluorescência ao longo do seu espectro de emissão de fluorescência [3].

Finalmente, deve ser lembrado que o padrão e a molécula a ser analisada devem ser estudados sob as mesmas condições de temperatura e viscosidade do solvente. Além disso, é sempre melhor trabalhar em baixas densidades óticas, a fim de evitar correções para o efeito de filtro interno. O rendimento quântico é então calculado de acordo com a equação 6:

$$\frac{\phi_S}{\phi_R} = \frac{A_S}{A_R} \times \frac{OD_R}{OD_S} \times \frac{n_S^2}{n_R^2} \quad (6)$$

onde ϕ_S e ϕ_R são os rendimentos quânticos de fluorescência da amostra e da referência, respetivamente, A_S e A_R são as áreas do espectro de fluorescência da amostra e da referência, respetivamente, OD_R e OD_S são as respectivas densidades óticas da amostra e da solução de referência no comprimento de onda de excitação, e n_S^2 e n_R^2 são os valores do índice de refração para os respetivos solventes usados [3].

1.2.3. Anisotropia de Fluorescência

Medições de anisotropia são vulgarmente utilizadas nas aplicações bioquímicas de fluorescência. As medições da anisotropia fornecem informações sobre o tamanho e forma de proteínas ou a rigidez de diferentes ambientes moleculares, sendo diversas vezes usadas para medir as associações proteína-proteína, a fluidez das membranas, e para imunoensaios de numerosas substâncias [4].

As medições de anisotropia são baseadas no princípio de excitação fotosselativa de fluoróforos por luz polarizada. Os fluoróforos absorvem preferencialmente fótons cujos vetores elétricos estão alinhados paralelamente ao momento de transição do fluoróforo. Esta excitação seletiva resulta numa população parcialmente orientada de fluoróforos (fotosseleção), e na emissão de fluorescência parcialmente polarizada. A anisotropia de fluorescência (r) e a polarização (P) são definidas pelas equações 7 e 8

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (7)$$

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (8)$$

onde I_{\parallel} e I_{\perp} são as intensidades de emissão polarizada de fluorescência na vertical (\parallel) e na horizontal (\perp), quando a amostra está excitada com luz polarizada verticalmente. Vários fenômenos podem alterar a anisotropia medida para valores mais baixos do que os valores máximos teóricos. A causa mais comum é a difusão de rotação. Tal difusão ocorre durante o tempo de vida do estado excitado e desloca o dipolo de emissão do fluoróforo. A medição deste parâmetro fornece informações sobre o deslocamento angular relativo do fluoróforo entre os tempos de absorção e emissão. Em fluidos, a maioria dos fluoróforos giram extensivamente durante 50 a 100 ps. Assim, as moléculas podem rodar muitas vezes durante os 1-10 ns de vida do estado excitado e a orientação da emissão polarizada é aleatória. Por esta razão, os fluoróforos em solução não-viscosa geralmente exibem anisotropias próximas de zero. A transferência de excitação entre fluoróforos também resulta na diminuição da anisotropia [4].

Moléculas mais pequenas têm tempos de correlação mais curtos e esperam-se anisotropias inferiores que nas moléculas maiores. As taxas de rotação dos fluoróforos em membranas celulares também podem ocorrer na escala de tempo nano, e os valores de anisotropia são, portanto, sensíveis à composição da membrana. Por estas razões, as medições de polarização de fluorescência são amplamente usadas para estudar as interações de macromoléculas biológicas [4].

1.2.4. Transferência de Energia de Ressonância

Outro processo importante que ocorre no estado excitado é a transferência de energia de ressonância (RET). Este processo poderá ocorrer sempre que o espectro de emissão de um fluoróforo, chamado o dador, se sobrepõe com o espectro de absorção de uma outra molécula, denominada aceitante [4].

O aceitante não necessita de ser fluorescente. É importante compreender que a RET não envolve emissão de luz pelo dador. Tais processos de reabsorção são dependentes da concentração total do aceitante, e de fatores não moleculares de menor interesse, tais como o

tamanho da amostra. O dador e o aceitante estão acoplados por uma interação dipolo-dipolo. Por estas razões o termo RET é preferido em relação ao termo transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), que também é de uso comum [4].

A extensão da transferência de energia entre as moléculas é determinada pela distância entre o dador e o aceitante, e o grau de sobreposição espectral (figura 6).

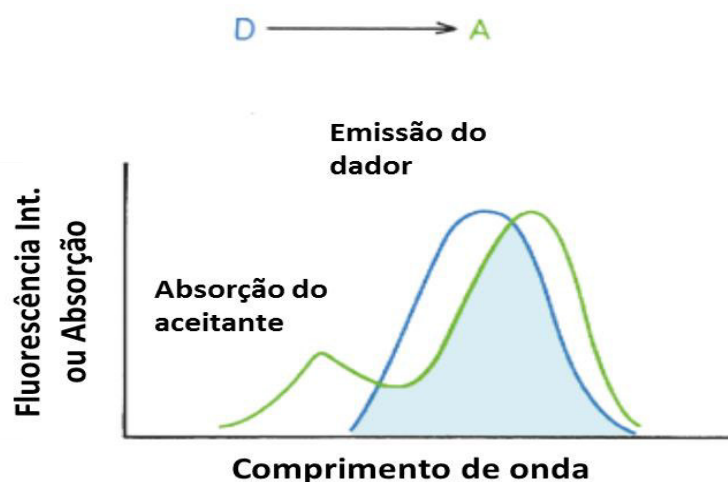


Figura 6 - Sobreposição espectral verificada na transferência de energia de ressonância (adaptado de [4]).

A eficiência de transferência de energia ϕ_{FRET} é dada por:

$$\phi_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (9)$$

em que r é a distância entre o dador (D) e aceitante (A) e R_0 raio de Förster [4].

1.2.5. Espectrofluorímetro

No espectrofluorímetro a luz proveniente de uma fonte com um espectro contínuo é passada através de um monocromador de excitação e utilizada para excitar uma amostra de fluorescência. A luz emitida a partir da amostra é passada através de um monocromador de emissão e subsequentemente detetada. Ao utilizar um espectro de varrimento no qual os comprimentos de onda transmitidos pelo monocromador de excitação e de emissão são variáveis, é possível examinar os dois espectros de emissão e excitação (figura 7). No espectro de emissão, o comprimento de onda da radiação de excitação é mantido constante e as medições

são realizadas a diferentes comprimentos de onda de emissão. No espectro de excitação, o comprimento de onda da radiação detetada é mantido constante, enquanto o comprimento de onda da radiação de excitação é variado [5].

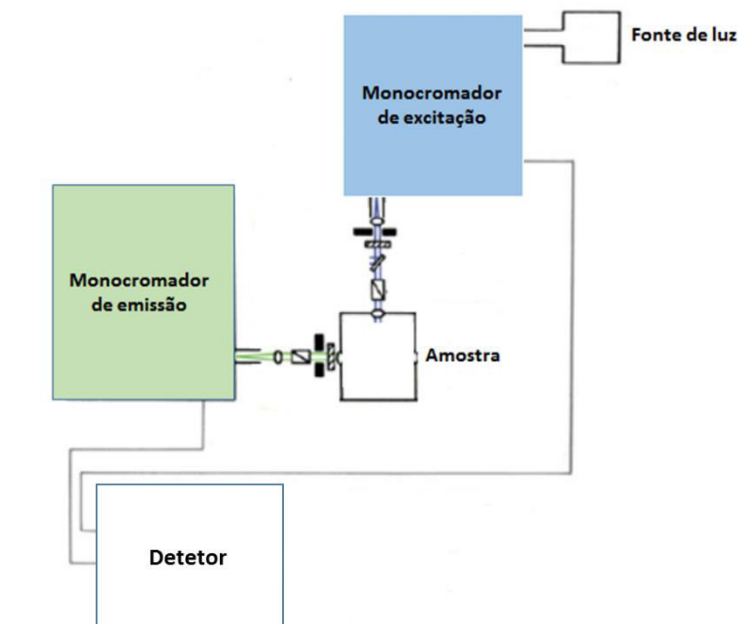


Figura 7 – Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro (adaptado de [4]).

A técnica aqui descrita demonstra uma sensibilidade excecional e grande seletividade e oferece espectros de excitação e de emissão facilmente corrigidos com o uso de uma fonte de luz padrão. A alta sensibilidade do instrumento permite utilizar baixos níveis de feixe de luz de excitação, evitando assim a fotodecomposição da amostra [5].

1.3. *Dynamic light scattering* (DLS)

A técnica de Difusão Dinâmica de Luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) é um dos métodos mais utilizados para determinar o tamanho de partículas. Um feixe luminoso de luz monocromática, como por exemplo um laser, numa solução de partículas esféricas em movimento browniano, causa um desvio Doppler quando a luz atinge a partícula em movimento, mudando o comprimento de onda da luz recebida. Esta alteração está relacionada com o tamanho da partícula (figura 8). É possível calcular a distribuição de tamanhos da

nanopartícula esférica e fornecer uma descrição do movimento da partícula no meio, medindo o coeficiente de difusão da partícula e usando a função de autocorrelação [6].

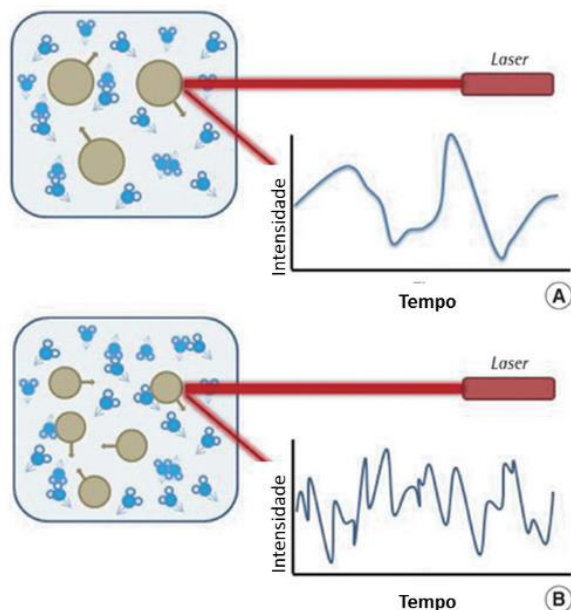


Figura 8 - Flutuação de luz dispersa na dispersão de luz dinâmica de (A) e grandes (B) partículas pequenas. As partículas maiores geram maior intensidade de dispersão do que as partículas mais pequenas [7].

Este método tem várias vantagens, como a duração da análise ser curta e é quase toda automatizada. Além disso, este método tem baixos custos de manutenção.

A vantagem da utilização da difusão dinâmica é a possibilidade de analisar amostras contendo amplas distribuições de espécies de massas moleculares muito diferentes (por exemplo, uma proteína nativa e diferentes tamanhos de agregados), e de detectar muito pequenas quantidades de espécies de massa mais elevadas ($<0,01\%$, em muitos casos) [6].

Com esta técnica, também é possível a obtenção de medições absolutas de vários parâmetros de interesse, polidispersividade da solução, o peso molecular, raio e a constante de difusão translacional [6].

1.4. Difração de Raios-X (XRD)

A Difração de raios-X (XRD) é uma técnica analítica rápida utilizada principalmente para a identificação da fase e composição de um material cristalino, podendo fornecer informações sobre as dimensões da célula unitária [8].

A difração de raios-X é agora uma técnica comum para o estudo de estruturas cristalinas e do espaçamento atômico. Esta técnica é baseada na interferência de raios-X monocromáticos numa amostra cristalina. Estes raios-X são gerados por um tubo de raios catódicos, que são filtrados para produzir radiação monocromática e dirigidos à amostra. Estes raios são gerados por aquecimento de um filamento para produzir elétrons, acelerando os elétrons para um alvo através da aplicação de uma tensão, bombardeando o material alvo com elétrons. Quando os elétrons têm energia suficiente para desalojar camadas internas de elétrons do material alvo, produzem-se espectros de raios X característicos. Um componente-chave de toda a difração é o ângulo entre o raio incidente e raios difratados. A interação dos raios incidentes com a amostra produz interferência construtiva (e um raio difratado) quando as condições satisfazem a Lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (10)$$

onde n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância entre planos atômicos e θ é o ângulo de incidência em relação ao plano considerado [8].

Esta lei refere-se ao comprimento de onda da radiação eletromagnética para o ângulo de difração e o espaçamento de rede numa amostra cristalina. Estes raios X difratados são então detetados, processados e contados. Ao digitalizar a amostra através de uma gama de ângulo 2θ , todas as possíveis direções de difração da estrutura devem ser alcançadas, devido à orientação aleatória do material em pó. A conversão dos picos de difração para espaçamentos d permite a identificação do mineral, porque cada mineral tem um conjunto de espaçamentos, d , únicos. Tipicamente, isto é conseguido através da comparação dos espaçamentos d com referências padrão [8].

1.5. *Scanning Electronic Microscopy (SEM)*

O microscópio eletrónico de varrimento é um poderoso instrumento que permite a observação e a caracterização de materiais e superfícies orgânicas e inorgânicas heterogêneas numa escala específica. A área a ser examinada ou o microvolume a ser analisado é irradiado com um feixe de elétrons minuciosamente focado, que pode ser estático ou movimentado sobre a superfície da espécie. Os tipos de sinais produzidos quando o feixe de elétrons incide sobre uma superfície de amostra incluem elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, fótons de várias energias, entre outros [9].

No SEM, os sinais de maior interesse são os elétrons secundários e os retrodifundidos, uma vez que estes variam de acordo com diferenças na topografia da superfície. A emissão de elétrons secundários está confinada a um volume próximo da área de impacto do feixe, permitindo, inclusive, que as imagens sejam obtidas com alta resolução. A alta resolução pode ir até valores da ordem de 2 a 5 nm em instrumentos comerciais, enquanto os instrumentos de investigação avançada estão têm alcançado resoluções melhor do que 1 nm [9].

Uma outra característica de importante relevância do SEM é o aspeto tridimensional da imagem da espécie analisada, resultando numa grande profundidade de campo, bem como o efeito de sombra-relevo do contraste de elétrons secundários e dos retro espalhados [9].

Os componentes básicos do SEM são o sistema de lentes, canhão de elétrons, coletor de elétrons, tubos de raios catódicos visuais e de gravação, e ainda toda a parte eletrónica que lhes está associada [9].

2. Referências do capítulo II

- [1] B. M. Weckhuysen, Ultraviolet-Visible Spectroscopy, *In-situ Spectroscopy of Catalysts*, 12 (2004) 255-270.
- [2] R. J. Anderson, D. J. Bendell, and P.W. Groundwater, Organic Spectroscopic Analysis *The Royal Society Chemistry*, 22 (2004) 1-10.
- [3] J. R. Albani, Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy, *Wiley-Blackwell*, (2007) 1-102.
- [4] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, *Springer*, 1 (2006) 1-27.
- [5] M. A. West; Applied Photophysics Limited. Spectrofluorimeter. United State Patent U_S 3975098 A. 1976.
- [6] M. Sartor, Dynamic Light Scattering, *University of California*, (2003) 2-21.
- [7] K. Hyun-A, et al., Nanometrology and its perspectives in environmental research, *Environ Health Toxicol*, 29 (2014) 1-9.
- [8] B. L. Dutrow and C. M. Clark, X-ray Powder Diffraction (XRD), *Geochemical Instrumentation and Analysis*, (2016)
- [9] J. I. Goldstein, et al., Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis, *Springer*, 3ª edição, (2003) 1-10.

CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreve efetivamente os protocolos experimentais, desde a preparação das soluções iniciais utilizadas, assim como todo o processo de síntese até à amostra final levada para análise através de inúmeras técnicas.

1. Materiais

O composto antitumoral estudado foi um derivado de tienopiridina (com a referência A3), sintetizado no Centro de Química da Universidade do Minho, cuja estrutura se apresenta na figura seguinte.

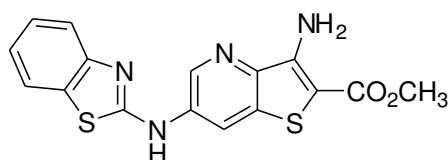


Figura 1 – Estrutura do composto antitumoral.

Todos os solventes utilizados foram de grau espectroscópico e usou-se água ultrapura. As propriedades de fluorescência deste composto em vários solventes foram estudadas previamente [1].

1.1. Estudo fotofísico do composto em lipossomas

As propriedades de fluorescência do composto A3 quando incorporado em lipossomas também foram estudadas, usando um lípido e um surfactante. As características de emissão deste composto antitumoral incorporado em lipossomas compostos por outros lípidos tinham sido estudadas anteriormente [1]. A concentração final do lípido/surfactante foi de 10^{-3} M e do composto 3×10^{-6} M, de modo a ter-se uma razão composto:lípido de 1:333.

Neste trabalho, foi utilizado o lípido:

- DOPG (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1-rac-glycerol)*)- lípido aniônico
T_m ~ -18 °C

e o surfactante:

- AOT (*sodium dioctyl sulfosuccinate*)- surfactante aniônico

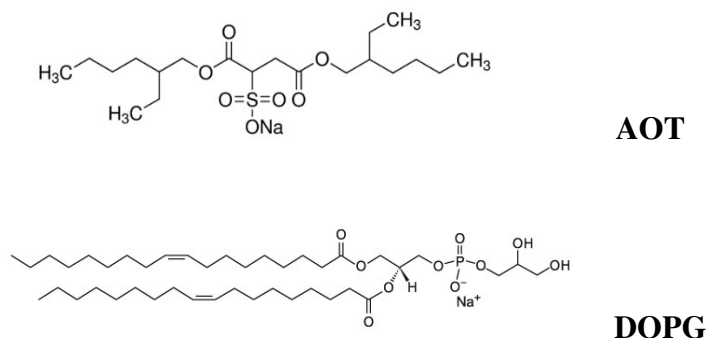


Figura 2 - Estrutura do surfactante (AOT) e do lípido utilizado (DOPG).

A solução *stock* do lípido DOPG foi preparada com uma concentração de 20,78mM e a do surfactante AOT com uma concentração de 0,05M, ambas em clorofórmio.

O solvente de todas as soluções foi evaporado com azoto e substituído na mesma quantidade por etanol (solvente miscível com água), para que as soluções ficassem nas mesmas concentrações.

1.2. Síntese de lipossomas com o composto

A preparação dos lipossomas com o composto A3 incorporado foi executada pelo método de injeção etanólica [2-4]. Esta técnica baseia-se na rápida injeção da solução etanólica de lípidos com o composto numa solução-tampão [5]. O tampão utilizado foi uma solução de Tris-HCl (base Tris(hidroxilamina)aminometano) com uma concentração de 10×10^{-3} M. O pH da solução foi acertado com ácido clorídrico concentrado até se obter um pH aproximadamente neutro, neste caso pH=7.2. Quando se realiza a injeção, a solução tampão deve encontrar-se a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase do lípido utilizado na preparação das vesículas; neste caso, estaria aproximadamente a 60 °C.

1.3. Medição da anisotropia

A emissão de fluorescência do composto A3 incorporado nos lipossomas foi monitorizada na fase gel (abaixo da T_m) e na fase líquido-cristalina (acima da T_m) dos lípidos. Uma vez que a temperatura de transição de fase do DOPG é muito baixa ($T_m \sim -18^\circ\text{C}$) [6], a sua análise foi realizada apenas à temperatura ambiente.

Os valores de anisotropia foram calculados a partir dos espectros de emissão de fluorescência, usando excitação com luz polarizada. As medições foram obtidas com os polarizadores na vertical e horizontal, na excitação e na emissão, também para temperaturas abaixo e acima da temperatura de transição de fase de cada lípido.

2. Síntese de nanopartículas de ferrite de cálcio (CaFe_2O_4)

As nanopartículas magnéticas de CaFe_2O_4 foram preparadas por diferentes métodos, utilizando Cloreto de Cálcio (CaCl_2) de massa molecular 110,98 g/mol e Cloreto de Ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de massa molecular 270,30 g/mol. Foram utilizadas como bases hidróxido de sódio (NaOH), neste caso uma base forte, e amónia (NH_4OH), uma base fraca, consoante o processo escolhido. Em alguns protocolos, foram utilizados surfactantes ou análogos para controlar a síntese das nanopartículas. No caso de haver dificuldade na dissolução das nanopartículas, foram utilizados vários solventes. A água utilizada na preparação das soluções foi água ultra pura.

2.1. Síntese de nanopartículas por coprecipitação em solução aquosa

As nanopartículas 2.1.a foram sintetizadas por um método de coprecipitação em solução aquosa de cloreto de ferro (III) hexahidratado e cloreto de cálcio, utilizando ácido cítrico de forma a controlar a reação [7].

Foram misturados, à temperatura ambiente, os iões Fe^{3+} e Ca^{2+} num gobelé e, seguidamente, juntou-se o ácido cítrico (2,5 M) numa razão estequiométrica em relação aos iões de 1:1. A mistura de iões mais o ácido cítrico é posteriormente adicionada, gota a gota, à solução de NaOH (11,48 M), num banho de óleo a 90°C . Foi utilizado óleo como base para o

banho, pois a oscilação na temperatura seria mais facilmente controlada e não ocorreria o risco de evaporar, como no caso da água. A solução é deixada no banho durante uma hora e trinta minutos.

Após a formação de nanopartículas, a amostra foi sujeita a várias centrifugações, de modo a excluir produtos indesejados. Foram realizadas cinco centrifugações, a primeira a 1000g durante 5 minutos, a segunda a 2000g durante 10 minutos, a terceira a 5000g durante 10 minutos e as duas restantes a 10000g durante 10 minutos. Entre cada centrifugação, a solução era ressuspenso em uma solução aquosa de HCl (0,1 M), para retirar os hidróxidos possivelmente formados, com o auxílio do vórtex, sendo que, após a última centrifugação, a amostra foi ressuspenso em H₂O (9 ml).

A amostra foi dividida em três tubos de ensaio (3 ml cada), sendo que a amostra de um dos tubos de ensaio não sofreu qualquer alteração para a análise (1); a outra amostra foi adicionado ácido láurico (C₁₂H₂₃O₂Na) e de seguida analisada (2); e a terceira amostra foi sujeita a uma última lavagem com ácido láurico (10000g, 10 min) e ressuspenso em água (3). O ácido láurico foi adicionado com uma razão estequiométrica 1:4 em relação à massa total do cálcio em cada tubo.

Foi utilizado o ácido láurico pela possibilidade deste conseguir homogeneizar melhor a solução, para que esta, ao ser analisada, neste caso no espectrofotómetro, não disperse a luz [8].

Tabela 1. Condições de preparação das partículas 2.1.a.

| | FeCl ₃ .6H ₂ O | CaCl ₂ | NaOH | Ácido cítrico |
|------------------|--------------------------------------|-------------------|---------|---------------|
| C inicial | 2M | 2M | 11,48M | 2,5M |
| V inicial | 750 µl | 375 µl | 2,97 ml | 900 µl |
| C final | 0,3M | 0,15M | 6,82M | 0,450M |
| V final | 5 ml | 5 ml | 5ml | 5ml |

2.2. Síntese de nanopartículas por coprecipitação em microemulsões

As nanopartículas de CaFe₂O₄ foram sintetizadas através da formação de microemulsões de micelas normais utilizando Dodecilsulfato de Sódio (SDS) (figura 3) como agente tensioativo aniónico, para assegurar a estabilidade das nanopartículas, fazendo com que não haja formação de agregados [9].

Os iões CaCl_2 (1 M) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 M) foram misturados num tubo de ensaio, com diferentes razões de Ca e Fe (as quantidades dos iões estão apresentadas nas tabelas 2.2.a.,

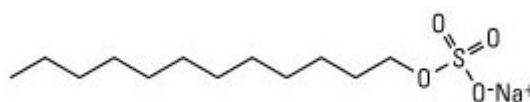


Figura 3 - Estrutura química do SDS.

2.2.b., 2.2.c., 2.2.d., 2.2.e. e 2.2.f.). Em seguida, adicionou-se uma solução aquosa de surfactante (28,8 g/L). Posteriormente, foi adicionada à mistura, acima dos 50 °C, amónia (5M) como base, sendo testadas várias concentrações. Todas as adições foram realizadas sob agitação vigorosa e num banho, a temperaturas acima dos 50 °C. Em seguida, a mistura reacional ficou em agitação magnética vigorosa durante 3 h, com as mesmas condições de temperatura. Após a síntese das nanopartículas de CaFe_2O_4 , estas foram isoladas por centrifugação com ciclos de 5 minutos a 8500g, sendo lavadas com etanol para eliminar o excesso de agente tensioativo. Este processo foi repetido quatro vezes. Depois de cada centrifugação e de ser retirado o sobrenadante, as partículas eram ressuspensas em etanol. Foi necessário transformar a solução em pó nanoparticulado para análise pela técnica de XRD. A amostra foi deixada na estufa *overnight* a 100 °C e posteriormente calcinada numa mufla a 700°C e a 900°C [10].

2.2.a.

Tabela 2. Condições de preparação das partículas 2.2.a.

| | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | CaCl_2 | Amónia | SDS | H_2O |
|--------------------|---|-----------------|--------|---------|----------------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 5 M | --- | 4,350 ml |
| C final | 0,075 M | 0,025 M | 0,15 M | 0,1 M | |
| V final | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | |
| V/m inicial | 375 µl | 125 µl | 150 µl | 0,144 g | |

As nanopartículas 2.2.a. foram preparadas por microemulsão em solução aquosa de cloreto de ferro (III) hexahidratado e cloreto de cálcio com uma razão estequiométrica de 2:1. A concentração da base está com um rácio de 2:1 em relação à concentração de cloreto de ferro (III) hexahidratado.

2.2.b.

Tabela 3. Condições de preparação das partículas 2.2.b.

| | FeCl₃.6H₂O | CaCl₂ | Amónia | SDS | H₂O |
|--------------------|---|-------------------------|---------------|------------|-----------------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 5 M | --- | 4,125 ml |
| C final | 0,075 M | 0,025 M | 0,375 M | 0,1 M | |
| V final | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | |
| V/m inicial | 375 µl | 125 µl | 375 µl | 0,144 g | |

O processo utilizado foi o acima descrito com a mesma razão estequiométrica dos iões Fe^{3+} e Ca^{2+} . No entanto, neste caso, a concentração de amónia em relação ao cloreto de ferro (III) hexahidratado é de 5:1.

2.2.c.

Tabela 4. Condições de preparação das partículas 2.2.c.

| | FeCl₃.6H₂O | CaCl₂ | Amónia | SDS | H₂O |
|--------------------|---|-------------------------|---------------|------------|-----------------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 5 M | --- | 3,750 ml |
| C final | 0,075 M | 0,025 M | 0,75 M | 0,1 M | |
| V final | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | |
| V/m inicial | 375 µl | 125 µl | 750 µl | 0,144 g | |

O processo utilizado foi o acima descrito com a mesma razão estequiométrica dos iões Fe^{3+} e Ca^{2+} . No entanto, neste caso, a concentração de amónia em relação ao cloreto de ferro (III) hexahidratado será de 10:1.

2.2.d.

Tabela 5. Condições de preparação das partículas 2.2.d.

| | FeCl₃.6H₂O | CaCl₂ | Amónia | SDS | H₂O |
|--------------------|---|-------------------------|---------------|------------|-----------------------|
| C inicial | 1M | 1M | 5M | --- | 3,375ml |
| C final | 0,075M | 0,025M | 1,125M | 0,1M | |
| V final | 5ml | 5ml | 5ml | 5ml | |
| V/m inicial | 375µl | 125µl | 1125µl | 0,144g | |

O processo utilizado foi o acima descrito com a mesma razão estequiométrica dos íons Fe^{3+} e Ca^{2+} . No entanto, neste caso, a concentração de amônia em relação ao cloreto de ferro (III) hexahidratado será de 15:1.

Foram preparadas nanopartículas pelo método de microemulsão mas, neste caso, com razões estequiométricas de íons 1:1. Foram escolhidas duas das concentrações de amônia acima testadas, a mais concentrada e a menos concentrada. As partículas 2.2.e. têm uma razão de concentrações de amônia e cloreto de ferro (III) hexahidratado 2:1 respectivamente e as 2.2.f. 10:1.

2.2.e.

Tabela 6. Condições de preparação das partículas 2.2.e.

| | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | CaCl_2 | Amônia | SDS | H_2O |
|--------------------|---|-------------------|-------------------|---------|----------------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 5 M | --- | 4,380 ml |
| C final | 0,06 M | 0,04 M | 0,12 M | 0,1 M | |
| V final | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | |
| V/m inicial | 300 μl | 200 μl | 120 μl | 0,144 g | |

2.2.f.

Tabela 7. Condições de preparação das partículas 2.2.f.

| | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | CaCl_2 | Amônia | SDS | H_2O |
|--------------------|---|-------------------|-------------------|---------|----------------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 5 M | --- | 3,900 ml |
| C final | 0,06 M | 0,04 M | 0,6 M | 0,1 M | |
| V final | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | |
| V/m inicial | 300 μl | 200 μl | 600 μl | 0,144 g | |

2.3. Síntese de nanopartículas com vários surfactantes (CTAB, SDS, Triton-X) e Ácido Cítrico

Por um processo análogo ao apresentado no protocolo 2.2., foram sintetizadas nanopartículas (2.3.a.) por coprecipitação em microemulsões com três surfactantes diferentes (SDS, CTAB, Triton-X), com o objetivo de diminuir o tamanho das nanopartículas e aumentar a dispersão das mesmas na solução.

O CTAB (Brometo de acetilmetilamônio) (figura 4) é um tensoativo catiónico, o SDS aniónico e o Triton-X não iónico [9, 11, 12].

Foram misturados os reagentes $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e CaCl_2 num gobelé e, de seguida, adicionados a uma solução aquosa de cada surfactante num banho de óleo a 90 °C. De modo a iniciar a formação das nanopartículas, adicionou-se NaOH, ficando esta solução durante 2 horas no banho. Todo este processo foi feito sob condições de agitação vigorosa.

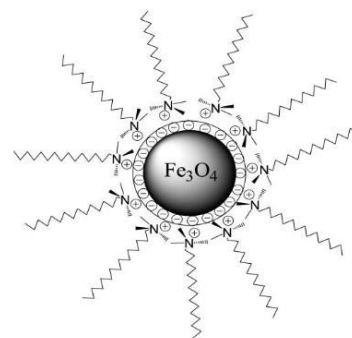


Figura 4 - Esquema da estrutura de magnetite rodeada por CTAB.

A fim de retirar produtos indesejáveis resultantes da reação, a amostra foi sujeita a 4 centrifugações (8500g durante 5 minutos). A ressuspensão da amostra, após se retirar o sobrenadante resultante das centrifugações, foi sempre realizada em etanol.

Tabela 8 - Condições experimentais das nanopartículas 2.3.a.

| | FeCl ₃ .6H ₂ O | CaCl ₂ | NaOH | CTAB | SDS | TritonX |
|-------------|--------------------------------------|-------------------|------|---------|---------|---------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 5 M | - | - | 1,9 M |
| V/m inicial | 500 µl | 250 µl | 1 ml | 0,182 g | 0.144 g | 263 µl |
| C final | 0,1 M | 0,05 M | 1 M | | 0,1 M | |
| V final | 5 ml | | | | | |

2.4. Síntese de nanopartículas em micelas invertidas

Na síntese de nanopartículas por meio de microemulsões 2.4.a., as partículas são formadas no interior de micelas invertidas por um processo semelhante ao descrito no capítulo I no ponto 1.3.2.

Em dois tubos de ensaio foram igualmente misturados Triton-X, que funcionou como surfactante, ciclohexano (solvente apolar) e n-heptanol como co-surfactante [12]. Num dos tubos de ensaio (A), foi adicionada uma solução aquosa dos iões, e no outro tubo (B) foi adicionada uma solução aquosa de NaOH. Todo este processo foi executado em agitação vigorosa no vórtex. De seguida, ambas as soluções foram colocadas num banho de ultrassons, para promover a homogeneização.

O início da reação dá-se quando a solução B é adicionada, gota a gota, sob agitação em vórtex, à solução A (figura 5).

A mistura foi levada a um banho de ultrassons durante aproximadamente 2 horas e, de seguida, prosseguiram-se com as lavagens (2 ciclos a 8500g durante 5 minutos cada). A amostra, no final de cada lavagem, foi ressuspensa em etanol.

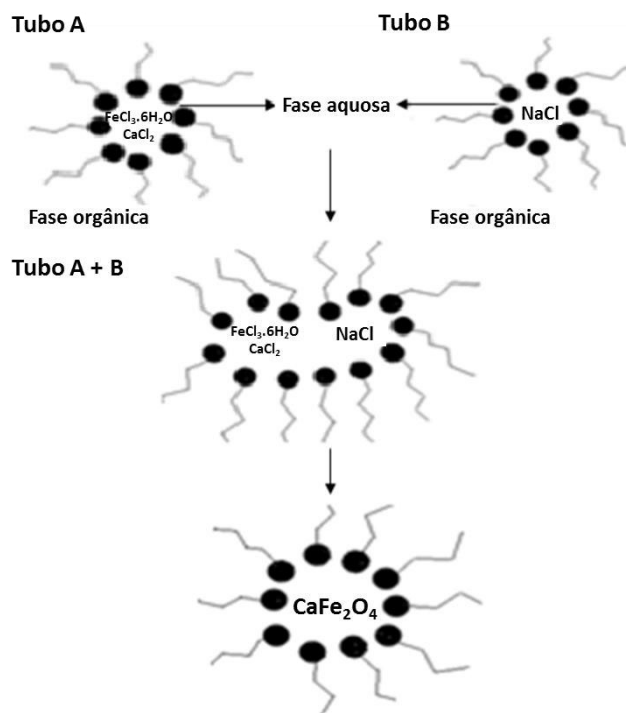


Figura 5 - Esquema da síntese de nanopartículas em micelas invertidas.

Tabela 9 - Condições experimentais da amostra A

| | Triton-X | Ciclohexano | n-heptanol | CaCl_2 | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | H_2O |
|------------------|-------------------|-------------|-------------------|-----------------|---|----------------------|
| C inicial | 1,9 M | 9,3 M | 7 M | 1 M | 1 M | |
| V inicial | 530 μl | 2,250 ml | 540 μl | 7 μl | 14 μl | 141 μl |
| C final | 0,3 M | 6 M | 1,09 M | 0,002M | 0,004 M | |
| V final | 3,482 ml | | | | | |

Tabela 10- Condições experimentais da amostra B

| | Triton-X | Ciclohexano | n-heptanol | NaOH | H_2O |
|------------------|-------------------|-------------|-------------------|------------------|----------------------|
| C inicial | 1,9 M | 9,3 M | 7 M | 11,48 M | |
| V inicial | 530 μl | 2,250 ml | 540 μl | 35 μl | 131 μl |
| C final | 0,3 M | 6 M | 1,09 M | 0,12 M | |
| V final | 3,486 ml | | | | |

3. Síntese de magnetolipossomas

Numa fase inicial, verificou-se que seria adequado apenas optar pela síntese de magnetolipossomas sólidos (SMLs), a fim de otimizar este tipo de nanossistemas. Ao longo dos diferentes protocolos, foram modificadas algumas variáveis, nomeadamente o tipo de lípido (DOPG, DPPC, DODAC), o tipo de solvente (clorofórmio, acetato de etilo e diclorometano), e as concentrações dos reagentes. Mais tarde, também se prepararam magnetolipossomas aquosos (AMLs).

Estas soluções foram posteriormente analisadas pela técnica de DLS para conferir os seus tamanhos.

3.1. Síntese de magnetolipossomas sólidos

3.1.1. Síntese de magnetolipossomas sólidos com diferentes tipos de lípidos (DOPG, DPPC, DODAC) e com surfactante AOT

As nanopartículas rodeadas por lípidos (magnetolipossomas sólidos) foram obtidas através da adição dos lípidos antes e depois da formação das nanopartículas [13]. Foram também sintetizadas nanopartículas (3.1.1.a) por coprecipitação com o procedimento idêntico ao dos magnetolipossomas, só que sem a adição de lípidos, como forma de comparação.

Foram misturados os iões em água e, de seguida, a mistura foi adicionada à solução de NaOH num banho a 80 °C com agitação magnética, sendo que esta ficou nestas condições durante 15 minutos.

Em seguida, a amostra foi sujeita a 4 centrifugações a 5000g durante 5 minutos cada. O sobrenadante, após as centrifugações, era retirado e a amostra era ressuspensa numa solução metanol/acetona (50%/50%), sendo que, na última centrifugação, a amostra foi ressuspensa em água.

Tabela 11- Condições das nanopartículas 3.1.1.a.

| | FeCl ₃ .6H ₂ O | CaCl ₂ | NaOH | H ₂ O |
|-----------|--------------------------------------|-------------------|---------|------------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 11,48 M | 2ml |
| V inicial | 8 µl | 4 µl | 40 µl | |
| C final | 0,0036 M | 0,0018 M | 0,2 M | |
| V final | 2,254 ml | | | |

A síntese dos magnetolipossomas (3.1.1.b) inicia-se com a mistura dos iões num gobelé e, de seguida, é adicionada água num tubo de ensaio, num banho a 80 °C com agitação magnética. Depois de a amostra estar estável relativamente à temperatura e acima da temperatura da transição de fase dos lípidos, foram adicionados 20% da quantidade de lípidos da primeira camada e, logo de seguida, a solução de NaOH. A amostra estabilizou durante 15 minutos e foram adicionados os 80% restantes da primeira camada lipídica. Neste momento, as nanopartículas estão rodeadas com apenas uma camada de lípidos (solução etanólica). A solução foi deixada no banho durante 15 minutos. As centrifugações foram idênticas ao protocolo anterior.

A amostra resultante das lavagens foi então aquecida novamente até aos 65 °C, para ser adicionada a segunda camada lipídica, desta vez na totalidade. A solução foi então deixada a estabilizar num banho a 80 °C durante 30 minutos [13]. A amostra foi novamente sujeita ao mesmo processo de lavagens anteriormente descrito.

Tabela 12- Condições dos magnetolipossomas 3.1.1.b.

| | FeCl ₃ .6H ₂ O | CaCl ₂ | NaOH | H ₂ O | DOPG Total | DOPG 20% | DOPG 80% |
|-----------|--------------------------------------|-------------------|----------|------------------|---------------|-------------|-------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 1 M | | 25 mg/ml | | |
| V inicial | 8 µl | 8 µl | 8 µl | 2 ml | 272 µl | 54 µl | 217 µl |
| C final | 0,0032 M | 0,0032 M | 0,0032 M | | | | |
| V final | 2,596 ml | | | | | | |

Por um procedimento análogo ao protocolo 3.1.1., também se prepararam magnetolipossomas secos com os lípidos DPPC, DODAC e o surfactante AOT. A alteração no protocolo, mais notória, refere-se à adição da segunda camada, onde a concentração lipídica

relativamente à da primeira camada foi aumentada 10 vezes para garantir que as nanopartículas fossem todas encapsuladas [13].

Tabela 13- Condições de síntese das nanopartículas utilizadas no processo análogo ao protocolo 3.1.1. com os vários tipos de lípidos.

| | FeCl ₃ .6H ₂ O | CaCl ₂ | NaOH | H ₂ O |
|-----------|--------------------------------------|-------------------|---------|------------------|
| C inicial | 1 M | 1 M | 11,48 M | 3,2 ml |
| V inicial | 200 µl | 100 µl | 1,5 ml | |
| C final | 0,04 M | 0,02 M | 3,44 M | |
| V final | 5 ml | | | |

Tabela 14- Condições das soluções lipídicas utilizadas na síntese dos diferentes magnetolipossomas para a formação da primeira camada.

| | DOPG | DODAC | DPPC | AOT |
|------------------------|------------------------|--------------|-------------|------------|
| C inicial | 0,03 M | 0,02 M | 0,027 M | 0,05 M |
| V inicial | 28 µl | 43 µl | 31 µl | 17 µl |
| C final | 1,7x10 ⁻⁴ M | | | |
| V final | 5 ml | | | |
| V_{20%} | 6 µl | 9 µl | 6 µl | 3 µl |
| V_{80%} | 23 µl | 34 µl | 25 µl | 14 µl |

Tabela 15 - Condições da segunda camada lipídica

| | DOPG | DODAC | DPPC | AOT |
|------------------|------------------------|--------------|-------------|------------|
| V inicial | 283 µl | 425 µl | 310 µl | 170 µl |
| C final | 1,7x10 ⁻³ M | | | |

3.1.2. Síntese de magnetolipossomas sólidos usando nanopartículas calcinadas

Estes magnetolipossomas foram sintetizados com a utilização de nanopartículas de um protocolo anterior (2.3.). Foram escolhidas apenas as nanopartículas formadas em CTAB. Com

o propósito de conseguirmos uma amostra mais homogênea, as nanopartículas foram calcinadas a 700 °C [14].

Foram pesados 74 mg do pó resultante da calcinação, para ser ressuspensionado em 1,5 ml de etanol para que as NPs estivessem numa concentração final de 0,3 M.

Desta solução foram retirados, para 3 tubos de ensaio, 167 µl e evaporado o etanol com azoto ultrapuro.

Ao filme resultante da evaporação, foram adicionados 2 ml de cada solvente polar num dos tubos de ensaio (clorofórmio/acetato de etilo/diclorometano), com o objetivo de se promover a destruição de possíveis agregados ainda existentes e evitar a formação de hidróxidos.

Num volume total de 2,5ml (2ml do solvente + 0,5 ml de solução de lípidos), o íão ferro estará aproximadamente a 2 mM, correspondente à concentração de lípidos quando se adiciona a primeira camada. De seguida, foram adicionados 125 µl do lípido (DOPG), a mistura foi homogeneizada no vortex e levada ao banho (65 °C) durante alguns minutos. Para finalizar a formação da primeira camada lipídica, foram adicionados mais 125 µl de DOPG e deixou-se a preparação durante 15 minutos no banho.

Prosseguiram-se com as centrifugações (4 x 8500g, durante 5 minutos), sendo que a amostra foi ressuspensionada em etanol entre as lavagens e na última foi evaporado todo o etanol e a amostra foi ressuspensionada em água.

O processo relativo à segunda camada foi igual ao da primeira. Depois da estabilização durante 15 minutos, fizeram-se as últimas centrifugações (2 x 8500, durante 5 minutos) antes da análise. A amostra foi ressuspensionada em etanol no final [15].

3.1.3. Verificação da formação da segunda camada lipídica dos magnetolipossomas sólidos

Foram sintetizados magnetolipossomas sólidos marcados com duas sondas fluorescentes diferentes. O lípido marcado NBD-C₁₂-HPC foi incluído na segunda camada lipídica, enquanto o lípido marcado Rodamina B-DOPE foi colocado na primeira camada lipídica. O grupo fluorescente NBD vai transferir energia (doador) para a Rodamina, sendo esta o aceitante (processo de FRET). Este processo só se verifica se a distância entre as duas sondas for suficientemente pequena para que ocorra a transferência de energia ($\leq 100 \text{ \AA}$).

Para a síntese dos magnetolipossomas, foi escolhido o protocolo de nanopartículas 2.2.a. Esta solução foi centrifugada (10000g durante 30 minutos) e retirado todo o sobrenadante.

Adicionaram-se 70 μl de água ao pellet e foi levado aos ultrassons durante 1 minuto. Foram então adicionados 3 ml de clorofórmio e, após agitação vigorosa no vórtex, foram adicionados 300 μl de DOPG (20 mM).

A solução foi sujeita a três centrifugações, em que a amostra foi sempre ressuspensa em metanol/acetona (50%/50%), exceto após a última centrifugação, em que foram adicionados 3 ml de água.

Após a injeção de 100 μl do lípido marcado com Rodamina (0,3 mM), a solução foi sujeita ao mesmo tipo de lavagens anteriormente executadas, com adição de 3 ml de água no final. Sob vórtex, foram adicionados mais 300 μl de DOPG e, de seguida, foram aplicadas duas centrifugações onde a ressuspensão das partículas depositadas foi em água. Por último, foram adicionados 104 μl do lípido marcado NBD- C_{12} -HPC ($2,9 \times 10^{-4}$ M). As últimas centrifugações foram feitas da mesma forma que as anteriores.

A solução lipídica de DOPG estava numa solução de metanol e todas as injeções foram feitas no vórtex, realizando-se 2 ciclos de 20 s em agitação vigorosa [16].

3.2. Síntese de magnetolipossomas aquosos (AMLs)

3.2.1. Síntese de magnetolipossomas aquosos (AMLs) marcados com sondas fluorescentes

Num tubo de ensaio, foram adicionados 94 μl de Egg-PC (lecitina do ovo) de concentração $3,2 \times 10^{-2}$ M, 0,27 μl de corante *Nile Red* (22 mM) e 20,7 μl do lípido marcado NBD- C_{12} -HPC ($2,9 \times 10^{-4}$ M). Esta solução foi posteriormente sujeita ao processo de evaporação e hidratada com um volume de etanol igual ao volume resultante da solução inicial. De seguida, injetou-se 3 ml de uma solução aquosa de nanopartículas sob agitação em vórtex, resultando numa concentração final de Fe de 0,1 M. A solução foi finalmente sujeita a uma centrifugação a 13000g durante 10 min. Obtiveram-se, assim, AMLs marcados com sondas fluorescentes para os estudos de interação com modelos de membranas biológicas [16].

4. Interação com modelos de membranas biológicas

4.1. Preparação dos modelos de membrana - GUVs

Foram utilizadas vesículas unilamelares gigantes (GUVs) de lecitina de soja como modelo de membranas biológicas.

A partir duma solução de lecitina a 0,03M, retirou-se 100 µl para um tubo de ensaio, sendo colocado num banho a 80 °C a evaporar. O filme resultante da evaporação da solução de lecitina foi pré-hidratado com 20-40 µl de água e foi incubado a 45 °C na estufa durante 15 minutos. De seguida, foram adicionados 3 ml de glucose (0,1 M) e deixado a incubar novamente durante 2 horas com uma temperatura de 37 °C. Após o tratamento de incubação, a solução foi centrifugada a 14000g durante 30 minutos à temperatura ambiente, para depositar elementos de maiores dimensões provenientes do processo de agregação [17, 18].

4.2. Estudos de transferência de energia

Para estudar a interação não-específica entre os magnetolipossomas (AMLs ou SMLs) e modelos de membranas biológicas (GUVs), foram realizados ensaios de transferência de energia ressonante de Förster (FRET).

Nos magnetolipossomas aquosos foram utilizados o lípido marcado com NBD-C₁₂-HPC (sonda hidrofóbica), neste caso, o doador, e a sonda *Nile Red* como aceitante. No caso dos magnetolipossomas sólidos foram utilizados dois lípidos marcados, novamente com NBD-C₁₂-HPC (doador) e o outro com Rhodamine B-DOPE (aceitante).

Estes ensaios permitem saber os magnetolipossomas conseguirão fundir com as células alvo, neste caso, os GUVs e posteriormente libertar o fármaco incorporado nos magnetolipossomas no interior das mesmas.

5. Referências do capítulo III

- [1] C.N.C. Costa, et al., A new antitumoral Heteroarylaminothieno[3,2-b]pyridine derivative: its incorporation into liposomes and interaction with proteins monitored by fluorescence, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13 (2014) 1730-1740.
- [2] S. Batzri and E.D. Korn, Single bilayer liposomes prepared without sonication, *BBA:Biomembranes*, 298 (1973) 10-15-1019.
- [3] J. M. H. Kremer, et al., Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method, *Biochemistry*, 16 (1977) 3932-3935.
- [4] J. R. Nordlund, et al., Transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine in large and small unilamellar vesicles, *Biochemistry*, 20 (1981) 3237-3241.
- [5] J. S. Dua, A. C. Rana, and A.K. Bhandari, Liposome: Methods of preparation and applications Internacional Journal of Pharmaceutical Studies and Research, Liposome: Methods of preparation and applications, *Internacional Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 3 (2012) 14-20.
- [6] <https://avantilipids.com/product/840475/>.
- [7] D. H. Chen and C.H. Hsieh, Synthesis of nickel nanoparticles in aqueous surfactant solutions, *J. Mate. Chem.*, 12 (2002) 2412-2415.
- [8] T. Hyeon, Chemical synthesis of magnetic nanoparticles, *CHEM. COMMUN.*, 8 (2003) 927-934.
- [9] L. P. Ramirez and K. Landfester, Magnetic Polystyrene Nanoparticles with a High Magnetite Content Obtained by Miniemulsion Processes, *Macromol. Chem. Phys.*, 204 (2003) 22-31.
- [10] L. Chao, A. J. Rondinone, and Z. J. Zhang, Synthesis of magnetic spinel ferrite CoFe₂O₄ nanoparticles from ferric salt and characterization of the size-dependent superparamagnetic properties, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 37-45.
- [11] K. Kamyar, et al, Preparation and Characterization of CTAB-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 42 (2012) 644-648.
- [12] S. Santra, et al, Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants, *Langmuir*, 17 (2001) 2900-2906.
- [13] C. J. Meledrandi, T. Ninjbadgar, and D. F. Brougham, Size controlled magnetoliposomes with tunable magnetic resonance relaxation enhancements, *Journal of Materials Chemistry*, 21 (2011) 214.

- [14] R. A. Candeia, et al., Synthesis and characterization of spinel pigment CaFe_2O_4 obtained by the polymeric precursor method, *Materials Letters*, 58 (2004) 569–572.
- [15] A. R. O. Rodrigues, et al, Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17 (2015) 18011-18021.
- [16] A. R. O. Rodrigues, et al., Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs, *RSC Advances*, 6 (2016) 1-11.
- [17] Y. Tamba, H. Terashima, and M. Yamazaki, A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles, *Chem. Phys. Lipids*, 164 (2011) 351-358.
- [18] T. Tanaka, et al., La^{3+} and Gd^{3+} induce shape change of giant unilamellar vesicle of phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, 1564 (2002) 173-182.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As medidas de espectroscopia de absorção e fluorescência foram realizadas nos Laboratórios de Fotofísica I e II da Universidade do Minho. Os espectros de absorção foram medidos num espectrofotómetro UV–Vis–NIR Shimadzu, modelo UV–3101PC. Os espectros de emissão de fluorescência foram determinados num espectrofluorímetro Fluorolog 3 que inclui monocromadores duplos na excitação e emissão e controlo de temperatura nos sistemas onde se colocam as amostras. Em ambas as técnicas, foram utilizadas células de quartzo com 10 mm de percurso ótico.

As medidas de XRD foram obtidas no Departamento das Ciências da Terra, com um difractómetro Philips PW1710 e posteriormente analisadas pelo programa *Match*.

As imagens de microscopia foram conseguidas no Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT/UM) num Microscópio Eletrónico de Varrimento NanoSEM FEI Nova 2000 (FEG/SEM).

Os diâmetros médios, tanto das NPs como dos MLs, foram medidos num equipamento de Difusão Dinâmica de Luz (DLS) da Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS. A análise da amostra neste equipamento foi feita em células de polistireno com um percurso ótico de 10 mm.

1. Estudo fotofísico do composto em membranas lipídicas

O composto antitumoral A3 foi sujeito, anteriormente, a estudos de emissão de fluorescência em lipossomas sintetizados com diferentes lípidos e cargas à superfície, para temperaturas abaixo (25 °C) e acima (55 °C) da temperatura de transição de fase de cada fosfolípido [1].

Neste estudo, foram preparadas membranas lipídicas de DOPG (lípidio aniónico) e AOT (surfactante aniónico), que não tinham sido estudados antes. O DOPG apresenta-se com uma temperatura de transição de fase muito baixa (cerca de -18 °C), sendo apenas necessária a análise a 25 °C, visto o lípido estar já na fase fluida à temperatura ambiente.

A figura 1 apresenta os espectros de fluorescência do composto incorporado em lipossomas constituídos por DOPG ou incorporado nas micelas invertidas do surfactante AOT.

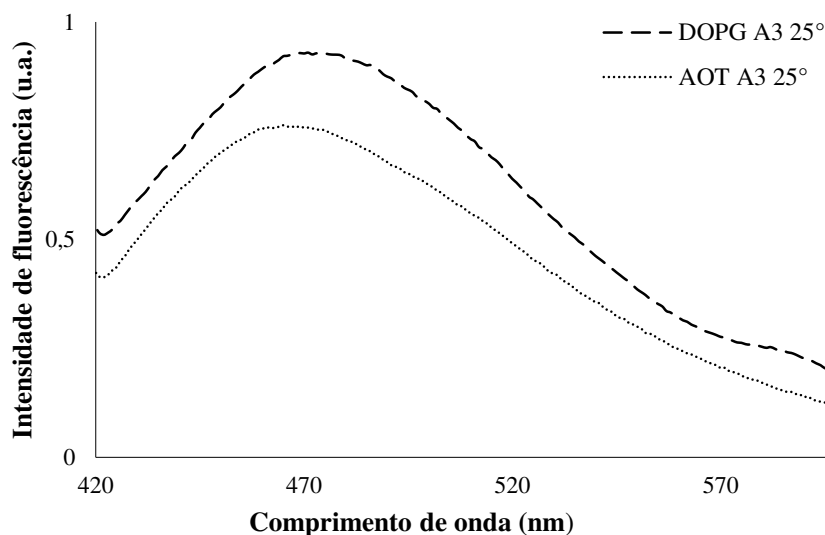


Figura 1- Espectro de fluorescência do composto A3 (3×10^{-6} M) em sistemas de AOT e DOPG a 25 °C.

O composto A3 exibe fluorescência quando incorporado nestes sistemas, evidenciando, deste modo, que está situado na bicamada lipídica de DOPG e na camada de surfactante das microemulsões de AOT, pois, anteriormente, observou-se que o composto não fluoresce em água [1], sendo um comportamento característico dos derivados de tieno[3,2-*b*]piridina [2]. Sendo assim, o composto antitumoral poderá ser transportado na zona hidrofóbica destes sistemas. Comparativamente aos estudos anteriores, o comprimento de onda máximo de emissão do composto em DOPG e AOT encontra-se na mesma zona de emissão do que nos restantes lípidos em que foi caracterizado [1].

Informações relevantes sobre a localização/comportamento deste composto antitumoral em lipossomas podem ser obtidas através de medições da anisotropia de fluorescência (r), sendo que o valor de anisotropia aumenta com o tempo de correlação rotacional da molécula fluorescente e, conseqüentemente, com a viscosidade do meio, representada pela equação 1:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad (1)$$

onde r_0 é a anisotropia intrínseca, τ é o tempo de vida do estado excitado e τ_c é o tempo de correlação rotacional. As anisotropias de fluorescência em estado estacionário do composto em DOPG e AOT são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de anisotropia de fluorescência (r) e comprimento de onda de emissão máximo (λ_{em}) para o composto A3 em DOPG e AOT.

| Lípido/Surfactante | T (°C) | Composto A3 | |
|--------------------|--------|---------------------|-------|
| | | λ_{em} (nm) | r |
| DOPG | 25 | 471 | 0.194 |
| AOT | 25 | 465 | 0.145 |

A fase líquido-cristalina do DOPG é detetada, à temperatura ambiente, pela apresentação de valores de anisotropia de fluorescência do composto relativamente baixos, quando comparados com os observados na fase gel de lípidos [1].

Os valores de anisotropia confirmam a localização do composto na camada lipídica ou de surfactante, sendo o ambiente sentido pelo composto mais hidratado no DOPG (maior comprimento de onda de emissão máximo).

2. Caracterização das nanopartículas de ferrite de cálcio

2.1. Espectros de absorção e análise por XRD

Durante a síntese das nanopartículas, alguns dos protocolos conduziram aparentemente à formação das mesmas, apresentando-se a solução final com tonalidades entre o preto e o castanho. A distinção da cor dos óxidos de ferro é justificada pelo seu grau de oxidação, sendo que pigmentos baseados em magnetite (Fe_3O_4) apresentam-se pretos, em ferrite (Fe_2O_4) entre o castanho escuro e o preto, enquanto que, em formas oxidadas como a maguemite (γ - Fe_2O_3), apresentam-se acastanhados e em hematite (α - Fe_2O_3) tons avermelhados [3, 4]. Tendo em consideração esta ocorrência, constatou-se que algumas soluções apresentavam parcialmente estas formas oxidadas, para além das nanopartículas desejadas.

Foram traçados os espectros de absorção no UV-Visível para caracterização das NPs da solução de nanopartículas resultante do protocolo 2.1. (Figura 2), optando também pelo auxílio da técnica de análise XRD, determinando a estrutura cristalina e, principalmente, a percentagem de ferrite de cálcio formada, nomeadamente nas NPs resultantes do protocolo 2.2. Ambas as técnicas foram executadas com o objetivo de comprovar a formação das NPs de ferrite de cálcio.

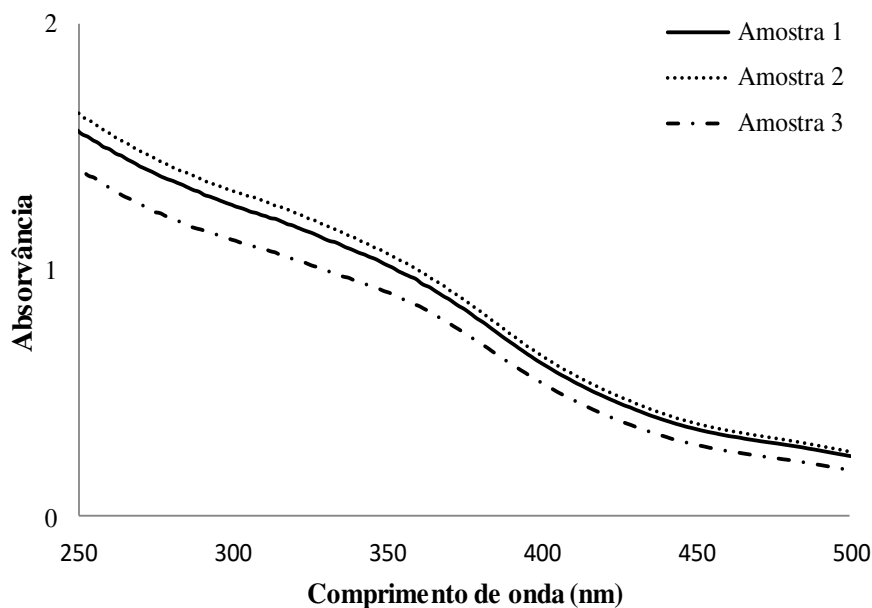


Figura 2- Espectros de absorção de várias amostras de nanopartículas de ferrite de cálcio. Amostra 1: sem presença de ácido láurico; Amostra 2: Adição de ácido láurico; Amostra 3: Lavagem com ácido láurico.

A intensidade e a largura da banda de absorção estão relacionadas com o tamanho médio das partículas e com a dispersão de tamanhos das partículas, respetivamente [5].

Sendo assim, a amostra 3 sugere NPs com dimensões ligeiramente mais pequenas relativamente às outras; no entanto, todas as amostras apresentam bastante dispersão de tamanhos.

As partículas resultantes dos protocolos 2.2. e 2.3., nomeadamente as 2.2.a, as 2.2.e. e as 2.3.a- CTAB foram analisadas pela técnica de XRD (Figura 3 e 4).

Tendo em conta a análise feita pelo programa *Match*, conseguiu-se aferir realmente a formação de NPs de ferrite de cálcio, no entanto, em pouca quantidade. A amostra 2.2.a apresenta uma percentagem de ferrite de cálcio de 12%, sendo a maioria maguemite (88%), uma das formas oxidadas da ferrite, provocada possivelmente pelo aumento da temperatura (700 °C). A amostra 2.2.e. tem uma quantidade de maguemite ligeiramente inferior (85,4%) e, consequentemente, apresenta maior percentagem de ferrite de cálcio (14,1%).

Todas as amostras do protocolo 2.2. foram sujeitas a temperaturas de 700 °C. A análise por XRD revela que todas apresentam pouca percentagem de ferrite de cálcio. Como, inicialmente, as amostras também se apresentavam bastante amorfas, foram sujeitas a uma temperatura de 900 °C, com o propósito de tornar a amostra mais cristalina, o que era sugerido

por estudos anteriores [6]. No entanto, o tratamento a 900 °C tornou as amostras mais escassas no que diz respeito à percentagem de ferrite de cálcio.

O primeiro difratograma apresentado na figura 4 indica que podem ser partículas de ferrite de cálcio muito pequenas e/ou partículas amorfas. No entanto, tendo em conta os resultados de DLS, as dimensões das partículas apresentadas são efetivamente pequenas. Verifica-se que, realmente, o aumento da temperatura para as nanopartículas de ferrite de cálcio é desfavorável, pois a maioria sofre oxidação, transformando-se em maghemite (91%).

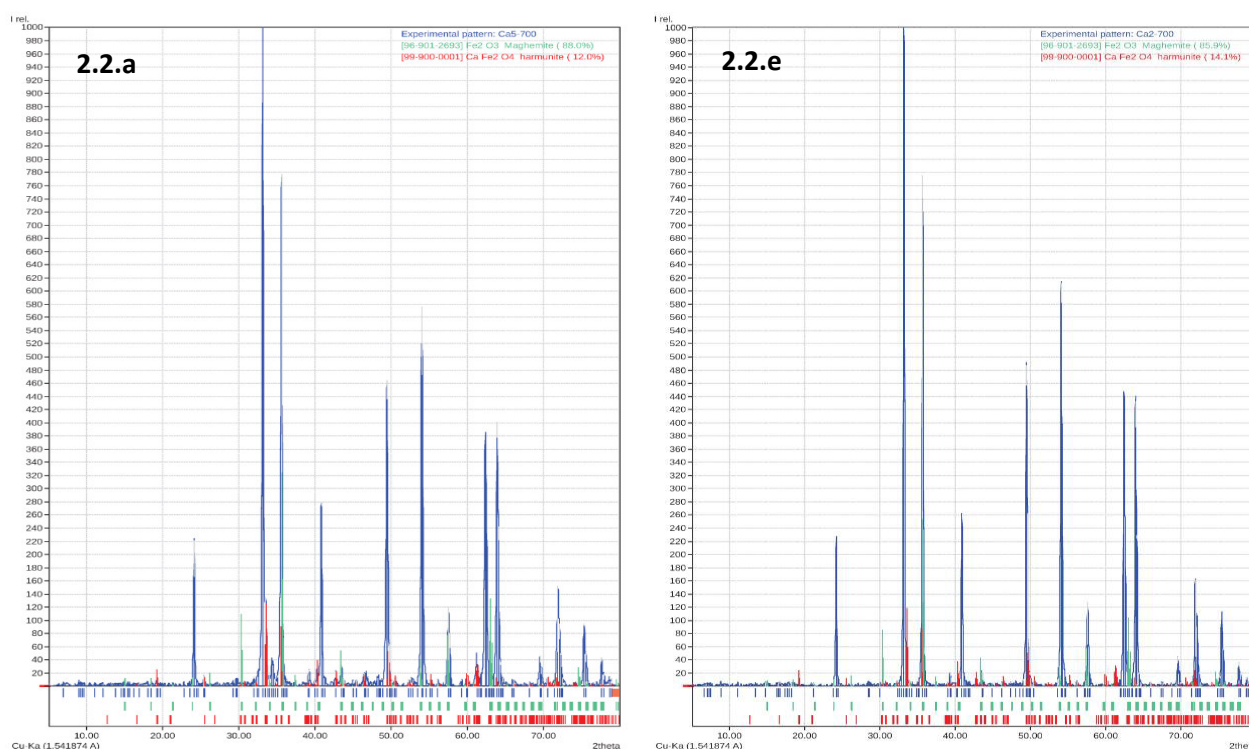


Figura 3 - Difratogramas das nanopartículas controladas por SDS, nomeadamente as NPs 2.2.a e 2.2.e.

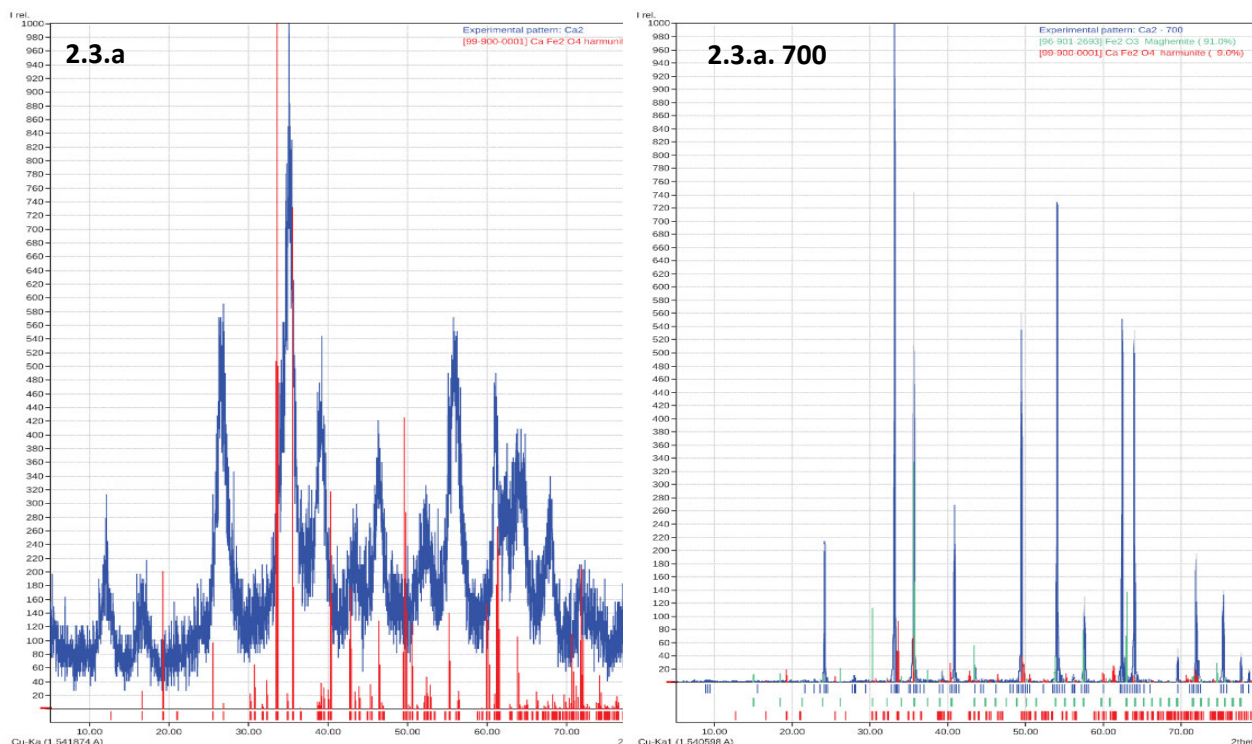


Figura 4 - Difratoograma das partículas do protocolo 2.3., nomeadamente das partículas controladas por CTAB.

2.2. Caracterização do tamanho e polidispersividade

A caracterização do tamanho e índice de polidispersividade das nanopartículas foi realizada pela técnica de difusão dinâmica de luz (DLS), sendo também necessária uma avaliação mais pormenorizada através da técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Os resultados da análise por DLS das nanopartículas preparadas pelos protocolos mais promissores são apresentados na tabela 2. Os resultados obtidos apontam para variações nos tamanhos consoante o método selecionado. Os tamanhos determinados variaram entre os 85 nm e os 440 nm, sendo que os valores determinados são sobretudo resultado da agregação das partículas em solução aquosa.

O procedimento experimental que revelou nanopartículas com dimensões mais pequenas foi o executado por coprecipitação em microemulsões, de onde resultaram nanopartículas rodeadas por SDS, CTAB ou Triton X-100. Por outro lado, as nanopartículas que apresentaram maiores dimensões (mais agregados) foram as sintetizadas por coprecipitação, através de uma adaptação de um protocolo relativo à formação de magnetolipossomas secos.

Tabela 2 – Valores do diâmetro médio das nanopartículas com o desvio padrão (SD) associado e o índice de polidispersividade (PdI) obtidos por DLS.

| Amostra | Método | Ømédio ± SD (nm) | PdI |
|----------------|--|-----------------------------|------------|
| 2.1.a | Co-precipitação com ácido cítrico (amostra 1) | 205 ± 41 | 0.386 |
| 2.3.a | Co-precipitação (microemulsões de SDS) | 120 ± 24 | 0.270 |
| | Co-precipitação (microemulsões de CTAB) | 85 ± 17 | 0.147 |
| | Co-precipitação (microemulsões de Triton X-100) | 169 ± 34 | 0.166 |
| 2.4.a | Microemulsões de Triton X-100 (micelas invertidas) | 228 ± 46 | 0.423 |
| 3.1.1.a | Co-precipitação (semelhante a magnetolipossomas sólidos) | 440 ± 88 | 0.362 |

As nanopartículas controladas pelo tensioativo catiónico CTAB apresentaram os melhores resultados no que diz respeito ao tamanho dos diâmetros médios.

A técnica de DLS determina o tamanho de partículas em suspensão através da velocidade dos seus movimentos; no entanto, pode ser difícil distinguir as partículas individuais dos agregados que as mesmas possam apresentar. O índice de polidispersividade fornece informação acerca da homogeneidade da distribuição do tamanho do sistema de partículas e, idealmente, este deve ser menor que 0,3 [7]. Sendo assim, as partículas 2.1.a, 2.4.a e 3.1.1. são as partículas que mais evidenciam uma elevada taxa de agregação, não nos fornecendo o valor real do tamanho das nanopartículas. Mais uma vez, o protocolo de coprecipitação com CTAB demonstra as nanopartículas mais promissoras, visto apresentar o menor grau de aglomeração. Uma caracterização mais detalhada, com a possibilidade de observar as nanopartículas, nomeadamente medir os seus diâmetros médios, foi realizada pela técnica de SEM (microscopia eletrónica de varrimento). As imagens que são apresentadas (figura 5) são relativas ao protocolo 2.1. e à amostra 1. Estas foram tratadas pelo programa *ImageJ* de maneira a obtermos um valor médio das dimensões das NPs, no entanto, a resolução da imagem não foi suficientemente

favorável para aplicar os filtros deste programa havendo a necessidade de executar as medições manualmente. Esta análise não remete a valores precisos nem a uma distribuição homogênea de tamanhos (figura 6).

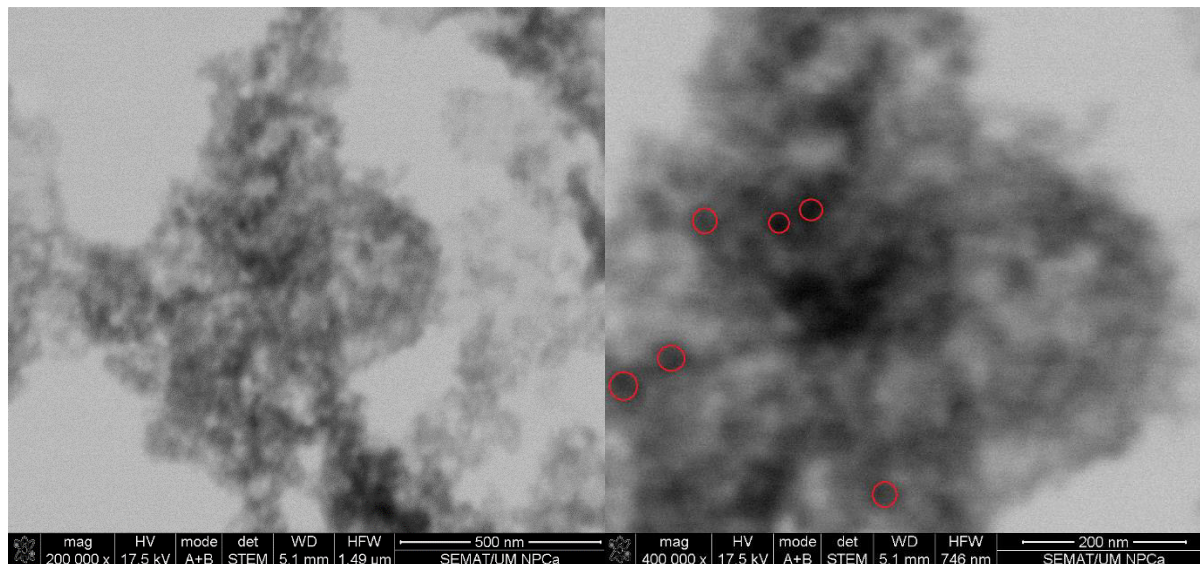


Figura 5 - Imagem de SEM de nanopartículas do ensaio com ácido cítrico com várias ampliações.

As imagens obtidas sugerem partículas muito pequenas, mas com uma elevada aglomeração, dando a indicação que os valores relativos ao diâmetro médio obtidos por DLS neste protocolo (205 ± 41) não são os verdadeiros. A dispersão de tamanhos devido aos possíveis aglomerados confere com a elevada polidispersividade (0.386).

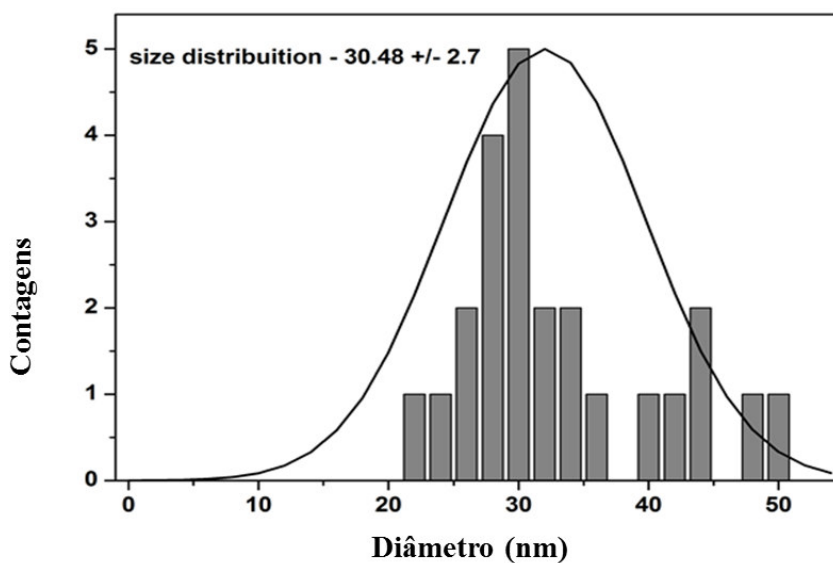


Figura 6 – Gráfico de distribuição de tamanhos das NPs a partir da imagem de SEM.

O gráfico de distribuição de tamanhos relativos ao protocolo utilizando ácido cítrico aponta para o valor médio de diâmetro das NPs de 30.48 nm com desvio padrão de 2.7.

2.3. Avaliação das propriedades magnéticas das nanopartículas

Como forma de avaliar o comportamento magnético das NPs, as amostras em pó foram submetidas à interação com um magneto. A título de exemplo, são apresentadas duas imagens relativas ao protocolo 2.2. Ambas as amostras foram sujeitas a uma temperatura de 700 °C, o que levou a perda das propriedades da ferrite e a formação de maguemite.

As amostras do protocolo 2.2. foram todas sujeitas à ação do magneto, depois de serem submetidas à temperatura de 700 °C, verificando-se, na maior parte, apenas a atração das NPs junto à parede do *eppendorf* (figura 7). Este efeito coincide com o facto de, na análise de XRD, a percentagem de ferrite não ser suficiente para se sentir o magnetismo de todas as NPs.

Após a calcinação a 900 °C, o efeito do magneto foi inútil e as NPs deixaram de responder totalmente. Mais uma vez, o aumento da temperatura é desfavorável para as NPs de ferrite de cálcio.



Figura 7 - Imagens da reação das partículas 2.2.a e 2.2.e., respetivamente, ao magneto.

3. Caracterização dos magnetolipossomas

Os magnetolipossomas sólidos (SMLs) preparados foram também caracterizados por DLS, para os vários lípidos usados.

Em termos de comparação, também foram sintetizadas nanopartículas magnéticas 3.1.1.a. com um processo semelhante ao dos magnetolipossomas 3.1.1. aqui analisados; no entanto, não houve a adição dos lípidos. Relativamente aos magnetolipossomas resultantes do protocolo 3.1.1., percebe-se que a adição de lípidos às nanopartículas é favorável. A adição dos lípidos permitiu reorganizar os aglomerados das nanopartículas, tornando-os mais pequenos quando são rodeados pelos lípidos. Surgem, efetivamente, magnetolipossomas de menor tamanho, nomeadamente entre 124 nm e 303 nm, quando comparados com as nanopartículas, que apresentaram um diâmetro médio de 404 nm com um índice de polidispersividade elevado.

Os resultados de DLS do protocolo 3.1.2 sugerem que ocorreu a formação dos SMLs, devido ao ligeiro aumento do diâmetro médio relativamente às NPs utilizadas, provocado pelo comprimento das moléculas lipídicas e do surfactante rodeando os aglomerados de NPs. Neste caso, as NPs do protocolo 2.3. rodeadas por CTAB, com um diâmetro médio de 85 nm, resultaram em magnetolipossomas com diâmetros entre os 149 nm e os 221 nm.

Regra geral, pode afirmar-se que a adição dos lípidos em torno das NPs leva a um controlo dos seus tamanhos e evita a possível aglomeração (tabela 3).

Tabela 3 - Valores do diâmetro médio dos magnetolipossomas secos com o desvio padrão (SD) associado obtidos por DLS.

| Protocolo de preparação | Lípido/surfactante na dupla camada | Solvente | $\phi \pm \text{SD (nm)}$ |
|-------------------------|------------------------------------|------------------|---------------------------|
| 3.1.1. | DOPG | Água | 124 ± 25 |
| | AOT | Água | 303 ± 55 |
| | DPPC | Água | 194 ± 32 |
| | DODAC | Água | 243 ± 48 |
| 3.1.2 (partículas 2.3) | DOPG | Diclorometano | 149 ± 30 |
| | | Acetato de etilo | 221 ± 44 |
| | | Clorofórmio | 204 ± 40 |

Para os magnetolipossomas aquosos (AMLs), verificou-se anteriormente que as nanopartículas pequenas encapsuladas em lipossomas não influenciam o seu tamanho. Por isso, optou-se apenas pela avaliação dos tamanhos dos magnetolipossomas secos [8-10].

4. Ensaio de interação dos MLs com modelos de membrana por FRET

4.1. Ensaio de interação dos AMLs com GUVs

A interação não específica dos magnetolipossomas aquosos (AMLs) com modelos de membranas celulares (vesículas unilamelares gigantes, GUVs) foi avaliada por transferência de energia de ressonância de Förster (FRET). Para avaliar essa transferência de energia, foram incorporados na bicamada lipídica dos AMLs o lípido marcado NBD- C_{12} -HPC, tendo o NBD (nitrobenzodiazole) a função de doador de energia, e o corante hidrofóbico *Nile Red*, como aceitante de energia [11-15].

A eficiência de FRET é determinada pela distância doador-aceitante, que não deverá ser superior a 100 Å para ocorrer FRET, e pela sobreposição espectral entre a banda de fluorescência do doador e absorção do aceitante [16]. Na figura 8, apresenta-se o espectro de fluorescência dos AMLs com NBD- C_{12} -HPC e *Nile Red*, antes e depois da interação com os GUVs.

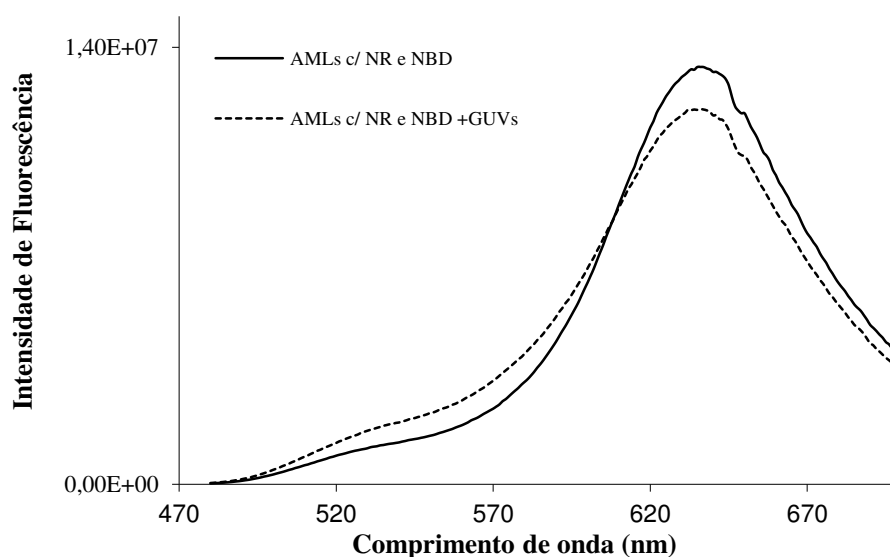


Figura 8 - Espectro de fluorescência dos AMLs de Egg-PC (lecitina do ovo) e NPs de $CaFe_2O_4$ contendo o lípido marcado NBD- C_{12} -HPC e a sonda *Nile Red*, antes e após a fusão com os GUVs.

Se ocorrer fusão dos magnetolipossomas aquosos com a membrana dos GUVs, vai dar-se um aumento de tamanho dos AMLs e, conseqüentemente, a distância doador-aceitante torna-se maior, resultando numa transferência de energia menos eficiente. Os espectros de fluorescência da amostra dos AMLs, antes e após a interação com GUVs, foram medidos excitando apenas o doador NBD. Assim, o aceitante (*Nile Red*) não é excitado diretamente, de forma que a sua emissão de fluorescência é apenas consequência da transferência de energia a partir do doador NBD.

Inicialmente, nos AMLs com NBD e *Nile Red*, são visíveis duas bandas de emissão de fluorescência, em que a primeira corresponde à emissão do NBD- C_{12} -HPC e a segunda (a maior comprimento de onda) à emissão do *Nile Red*. A segunda banda apresenta-se com forte intensidade, devido à transferência de energia das moléculas excitadas do NBD para o *Nile Red*. Posteriormente à interação dos GUVs com os AMLs, a banda de emissão de fluorescência do *Nile Red* (aceitante) diminui e a do NBD (doador) aumenta, confirmando um aumento na distância entre as sondas devido à fusão dos AMLs com os GUVs, conforme ilustrado na figura 9.

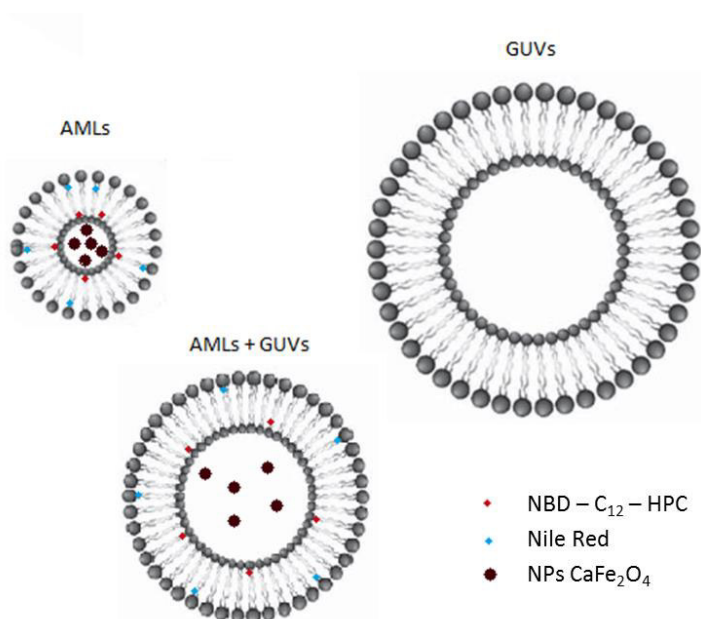


Figura 9 - Esquema do processo de fusão dos AMLs marcados e os GUVs.

Assim sendo, magnetolipossomas com nanopartículas de ferrite de cálcio são úteis como nanotransportadores de fármacos direcionados por um campo magnético, podendo libertar os mesmos através da fusão com as membranas celulares.

4.2. Formação de SMLs e interação com GUVs

Para além dos AMLs, o FRET foi também analisado nos SMLs. Os SMLs apresentam uma melhor resposta magnética, mantendo quase todas as propriedades magnéticas das NPs e, comparativamente aos AMLs, as suas características magnéticas são mais fortes, visto os AMLs se comportarem como um ferrofluido [17].

Sendo assim, ensaios de FRET foram também utilizados para comprovar a formação da bicamada lipídica dos SMLs de DOPG em torno das nanopartículas de CaFe_2O_4 .

A síntese dos SMLs iniciou-se com a formação da primeira camada, onde foi incluído o lípido marcado com rodamina B-DOPE (aceitante de energia) e, posteriormente, foi feita a adição da segunda camada com o lípido marcado NBD- C_{12} -HPC (doador de energia) (figura 10).

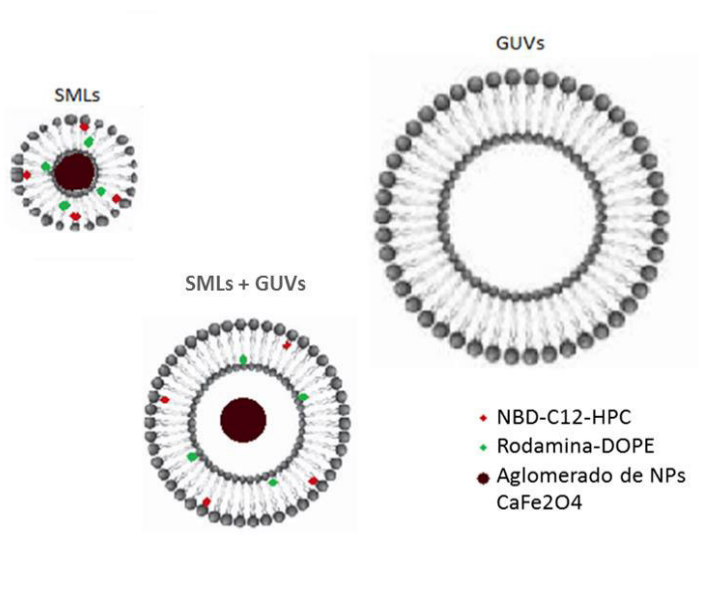


Figura 10 - Esquemas dos SMLs marcados e interação com GUVs.

A emissão dos SMLs marcados somente com o doador, neste caso o NBD, foi comparada com a dos SMLs com ambos os lípidos marcados, onde somente o doador de energia foi excitado.

Comparando os espectros de fluorescência dos dois sistemas, o sistema com ambos os lípidos marcados apresenta uma diminuição na banda de emissão do NBD e a presença de uma emissão pronunciada da Rodamina B, provando a transferência de energia do NBD para a Rodamina. A banda quase impercetível corresponde à emissão do sistema apenas com

Rodamina, quando excitamos no comprimento de onda do NBD. Assim, verifica-se que a banda mais pronunciada no sistema com os dois fluoróforos realmente corresponde à transferência de energia, e não à excitação direta da rodamina (figura 11).

A eficiência de FRET, Φ_{RET} , definida como a proporção de moléculas doadoras que transferem o seu excesso de energia para moléculas aceitantes, é dada pela equação 2:

$$\Phi_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2)$$

Através da eficiência de FRET, foi também calculada a distância entre as moléculas doadoras e aceitantes (r) pela equação 3:

$$r = R_0 \cdot \left[\frac{1 - \Phi_{RET}}{\Phi_{RET}} \right]^{1/6} \quad (3)$$

onde R_0 é o raio de Förster.

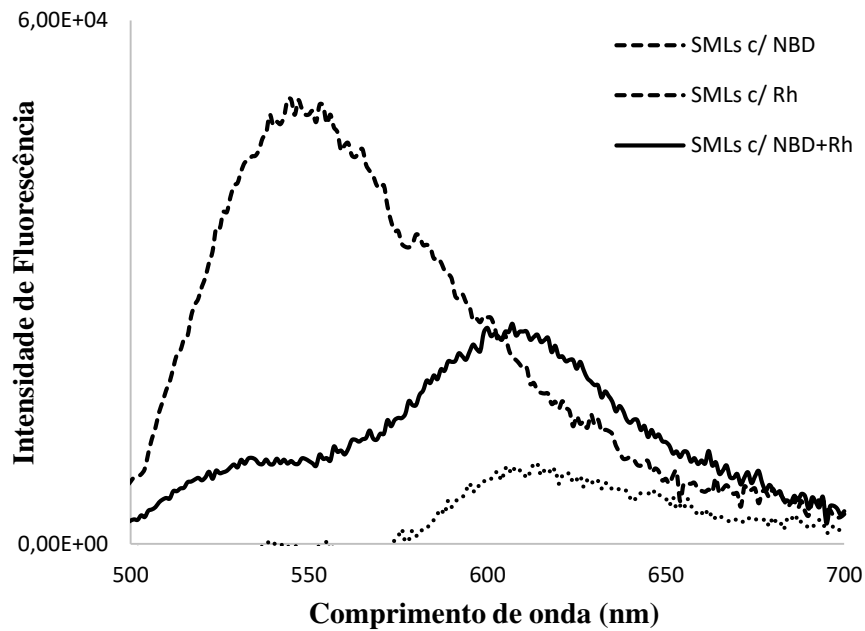


Figura 11 - Espectros de fluorescência de SMLs com NBD- C_{12} -HPC, Rodamina-DOPE e com ambos os lípidos marcados, excitando apenas o marcador NBD.

A partir dos resultados obtidos, foi calculada uma eficiência de FRET de 74%, com uma distância entre doador-aceitante de 4,4 nm. Visto a membrana da célula apresentar, regra geral, uma espessura de 7 a 9 nm, poderá concluir-se que os lípidos marcados Rodamina-DOPE e NBD- C_{12} -HPC localizam-se na primeira e segunda camada lipídica, respetivamente, em torno dos aglomerados de nanopartículas, confirmando a síntese dos SMLs [18].

Para o estudo de interação dos SMLs com modelos de membrana foram incluídos os mesmos lípidos marcados na bicamada dos SMLs. Após a fusão com os GUVs, foi verificada novamente (tal como nos AMLs), uma diminuição da intensidade de fluorescência da sonda aceitante (Rodamina) e um aumento da banda do doador (NBD), confirmando a fusão dos SMLs com os GUVs (figura 12).

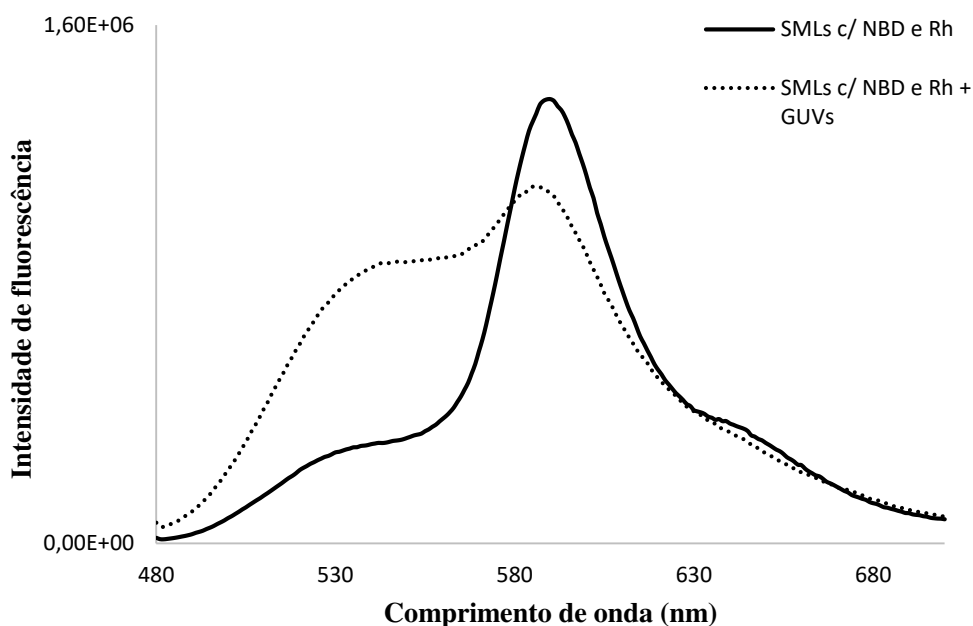


Figura 12- Espectros de fluorescência de SMLs com NBD- C_{12} -HPC e Rodamina-DOPE, antes e depois da interação com GUVs.

5. Referências do capítulo IV

- [1] C.N.C. Costa, et al., A new antitumoral Heteroarylaminothieno[3,2-b]pyridine derivative: its incorporation into liposomes and interaction with proteins monitored by fluorescence, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13 (2014) 1730-1740.
- [2] M. J. R. P. Queiroz, et al., New potential antitumoral di(hetero)arylether derivatives in the thieno[3,2-b]pyridine series: Synthesis and fluorescence studies in solution and in nanoliposomes, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 238 (2012) 71-80.
- [3] D.K. Kim, et al., Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225 (2001) 30-36.
- [4] A. S. Teja and P.-Y. Koh, Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55 (2009) 22-45.
- [5] N. Leopold and B. Lendl, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B.*, 107 (2003) 5723-5727.
- [6] R.A. Candeia, et al., Synthesis and characterization of spinel pigment CaFe_2O_4 obtained by the polymeric precursor method, *Materials Letters*, 58 (2004) 569-572.
- [7] S. Kashanian, A. H. Azandaryani, and K. Derakhshandeh, New surface-modified solid lipid nanoparticles using N-glutaryl phosphatidylethanolamine as the outer shell, *International Journal of Nanomedicine*, 6 (2011) 2393-2401.
- [8] A.R.O. Rodrigues, et al., Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs, *RSC Advances*, 6 (2016) 1-11.
- [9] A.R.O. Rodrigues, et al., Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17 (2015) 18011-18021.
- [10] A.R.O. Rodrigues, et al., Magnetoliposomes based on nickel/silica core/shell nanoparticles: Synthesis and characterization, *Materials Chemistry and Physics*, 148 (2014) 978-987.
- [11] G. Hungerford, et al., Monitoring ternary systems of C12E5/water/tetradecane via the fluorescence of solvatochromic probes, *J. Phys. Chem. B.*, 106 (2002) 4061-4069.
- [12] Greenspan, P. and S.D. Fowler, Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red, *J. Lipid Res.*, 26 (1985) 78 - 789.

- [13] G. Krishnamoorthy, Probing the link between proton transport and water content in lipid membranes, *J. Phys. Chem. B.*, 105 (2001) 1484-1488.
- [14] P.J.G. Coutinho, et al., Nile Red and DCM Fluorescence Anisotropy Studies in C12E7/DPPC Mixed Systems, *J. Phys. Chem. B.*, 106 (2002) 12841-12846.
- [15] E. Feitosa, et al., Cationic liposomes in mixed didodecyl-dimethylammonium bromide and dioctadecyldimethylammonium bromide aqueous dispersions studied by differential scanning calorimetry, Nile Red fluorescence, and turbidity, *Langmuir*, 22 (2006) 3579-3585.
- [16] Valeur, B., Molecular Fluorescence – Principles and Applications, *Wiley-VCH*, (2002) 1-399.
- [17] S. García-Jimeno, et al., Magnetoliposomes prepared by reverse-phase followed by sequential extrusion: Characterization and possibilities in the treatment of inflammation, *Int. J. Pharmaceut.*, 405 (2011) 181-187.
- [18] H. Curtis and N. Barnes, Biology, 5th edition, *Worth Publishers*, (1989).

V- CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

No âmbito deste projeto foram produzidas e caracterizadas nanopartículas de ferrite de cálcio, sendo, posteriormente, incorporadas com êxito em lipossomas.

Foi possível o estudo fotofísico de um composto potencialmente antitumoral derivado de tienopiridina, manifestando emissão de fluorescência quando incorporado em bicamadas lipídicas e em micelas invertidas de AOT. Os resultados sugerem estes sistemas como transportadores favoráveis do fármaco, sendo possível controlar a sua distribuição e apontando para aplicações futuras de entrega controlada no organismo.

Foram realizados vários processos de síntese de nanopartículas magnéticas de ferrite de cálcio, sendo que o método por microemulsões com auxílio de surfactantes foi o mais favorável, resultando em partículas com, aproximadamente, 85 nm de tamanho. Haverá a possibilidade destas dimensões serem relativamente menores, devido ao facto de ainda existir um grau significativo de aglomeração indicado pelo índice de polidispersividade.

A partir das nanopartículas resultantes do protocolo anteriormente citado, foi apurado o envolvimento das mesmas por lípidos pelo aumento de diâmetros dos magnetolipossomas aquosos comparativamente com os das nanopartículas. Nos protocolos de magnetolipossomas sólidos, as bicamadas lipídicas parecem ser uma boa alternativa para evitarem os aglomerados formados pelas nanopartículas.

Por fim, foi avaliada a interação não específica entre os magnetolipossomas aquosos e secos e modelos de membrana (GUVs) através de estudos de FRET. Em ambos os casos, ocorreu a diminuição da intensidade de fluorescência da sonda aceitante de energia, devido ao aumento da distância entre o dador e o aceitante, sugerindo a ocorrência de fusão. Esta informação indica que os magnetolipossomas com nanopartículas de ferrite de cálcio são úteis como nanotransportadores de fármacos quando aplicado um campo magnético externo, sendo possível a sua libertação através da fusão com as membranas celulares.

No entanto, após este trabalho, ainda é necessária investigação posterior com o objetivo de melhorar as características quer das nanopartículas, quer da sua incorporação em lipossomas. Neste contexto, são sugeridas algumas alternativas:

- Síntese de nanopartículas com outros revestimentos, evitando a agregação das mesmas, e incremento da sua estabilização em meio aquoso, nomeadamente com revestimentos de citrato ou poliacrilato, ou ainda com o auxílio de ácidos (por exemplo, DMSA),

possibilitando a presença de grupos livres para conjugar com outras biomoléculas, com o intuito de facilmente direcionar as NPs para o alvo pretendido e melhorar a sua biocompatibilidade.

- Reproduzir protocolos mais promissores e caracterizar as partículas através de técnicas mais poderosas, como a microscopia eletrónica de transmissão de alta resolução (HR-TEM) e microscopia de força atómica (AFM).
- Avaliar as propriedades magnéticas das nanopartículas produzidas e dos magnetolipossomas através da técnica de SQUID.
- Caracterizar os magnetolipossomas através da técnica de cryo-TEM.
- Realizar estudos de interação não específica com membranas modelo (GUVs) dos magnetolipossomas com o composto incorporado.
- Testar a citotoxicidade das nanopartículas de ferrite de cálcio e dos magnetolipossomas e avaliar o comportamento do composto antitumoral encapsulado em linhas celulares *in vitro*.